



TITLE:

異種及び同種精子によるハムスター
一卵子の体外受精に関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

今井, 裕

CITATION:

今井, 裕. 異種及び同種精子によるハムスター卵子の体外受精に関する
研究. 京都大学, 1983, 農学博士

ISSUE DATE:

1983-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k2945>

RIGHT:

新	制
農	
365	

京大附図

異種及び同種精子によるハムスター卵子の 体外受精に関する研究

1983

今 井 裕

異種及び同種精子によるハムスター卵子の
体外受精に関する研究

1983

今井 裕

目 次

第 1 章	緒 論	----- 1
第 2 章	透明帯除玄卵子への家畜精子 の侵入条件	----- 6
第 1 節	緒 言	----- 6
第 2 節	透明帯除玄卵子へのブタ精 子の侵入	----- 7
I.	実験材料および方法	----- 7
II.	実験結果	----- 15
III.	考 察	----- 22
IV.	摘 要	----- 30
第 3 節	透明帯除玄ハムスター卵子 への侵入に必要なブタ精子 の生理学的変化と <i>capacitation</i> との関係	----- 32
I.	実験材料および方法	----- 32
II.	実験結果	----- 33
III.	考 察	----- 35
IV.	摘 要	----- 37
第 4 節	透明帯除玄卵子へのウシ精	

子の侵入	39
I. 実験材料および方法	40
II. 実験結果	41
III. 考察	46
IV. 摘要	53
第5節 小 括	56
第3章 透明帯除去ハムスター卵子に 侵入前後の家畜精子の微細構 造的観察	59
第1節 緒 言	59
第2節 雌性生殖器内で培養後のブ タおよびヤギ精子の微細構 造的観察	61
I. 実験材料および方法	61
II. 実験結果	63
III. 考察	65
IV. 摘要	74
第3節 透明帯除去ハムスター卵子 内に侵入前後のブタ精子の 微細構造的観察	81

I.	実験材料および方法	81
II.	実験結果	83
III.	考 察	99
IV.	摘 要	103
第4節	小 括	105
第4章	ハムスター卵子の体外受精に 関する研究	107
第1節	緒 言	107
第2節	排卵産物を伴ったハムスタ ー卵子の完全合成培地内 での体外受精	110
I.	実験材料および方法	111
II.	実験結果	115
III.	考 察	117
IV.	摘 要	122
第3節	ハムスター卵子の体外受精 におよぼすエネルギー源の 影響	124
I.	実験材料および方法	125
II.	実験結果	129

Ⅲ、考 察	-----134
Ⅳ、摘 要	-----141
第4節 ハムスター卵子の体外受精	
におけるグルコースの役割	----144
Ⅰ、実験材料および方法	-----144
Ⅱ、実験結果	-----147
Ⅲ、考 察	-----151
Ⅳ、摘 要	-----157
第5節 小 括	-----159
第5章 総 括	-----164
謝 辞	-----173
引用文献	-----174
英文要旨	-----182

第1章 緒 論

哺乳動物においては、一般に膣あるいは子宮内に射出された精子は自身の前進運動と子宮の収縮運動によつて卵管内にまで押し上げられ、卵管膨大部に下降した排卵卵子に遭遇し、その部位で受精が成立する (Blandau, 1969; Gwatkin, 1977)。しかし、排卵直後の雌の子宮あるいは卵管内に射出精子を人為的に注入しても、精子はすぐには卵子に侵入せず、数時間を経過した後初めて侵入しうようになる。この現象をそれぞれ別個にラットとウサギを用いて観察した Austin (1951) と Chang (1951) は、雌性生殖器内を上走する間に何らかの生理学的変化が精子に誘起されると考えた。その後、Austin (1952) は精子に起こるこの生理学的変化を *capacitation* (受精能獲得) と命名した。現在までに *capacitation* の必要性が多くの哺乳動物の精子で証明されているが、その誘起に要する時間や環境条件は動物種によつて異なっている (Bedford, 1970; Chang and

Hunter, 1975)。

一方、体外で受精がおこなわれる棘皮動物などでは、射出後、数十秒以内に精子は卵子内に侵入する (Epel, 1980)。したがって、これらの動物種の精子では capacitation は必要でないが、あるいは必要であってもその誘起に要する時間はきわめて短いと考えられている。しかし、Dan (1952) はウニ精子の頭部先端が卵子への侵入直前になって形態的变化を起こすことを観察し、この現象を先体反応 (acrosome reaction) と命名した。その後、同様の現象は多くの無セキツイ動物の精子においても確認されるようになったが (Dan, 1967; Franklin, 1970), 哺乳動物においても、ハムスターで自然交配後体内から回収した卵子のまわりに先体反応の誘起された精子が観察された (Austin and Bishop, 1958)。その後、種々の哺乳動物種においても先体反応の誘起が確認されており (Bedford, 1970; Austin, 1975), 哺乳動物においても先体反応は精子が卵子に侵入する

前に経なければならぬ不可欠の現象であると考えられる。初期の *capacitation* の概念はおそらく先体反応を含めたものであったが、最近では *capacitation* の誘起された精子のみが先体反応を起こすと考えられている (Bedford and Cooper, 1978; Meizel, 1978; Yanagimachi, 1981)。

したがって、哺乳動物においては、受精にさきだって精子の *capacitation* と先体反応がいつ、どこで、どのようにして誘起され、またそれらの変化の受精における役割について多くの研究がなされるようになった。しかし、哺乳動物では、精子と卵子の相互作用や受精前後に生ずる精子や卵子の生理学的、形態学的変化を生体内条件下で正確に把握することは困難であるので、これらの研究の大部分は、精子と卵子を体外の試験管内に入れて受精の過程を直視下で観察するいわゆる体外受精の手法を用いて行われている。

capacitation の発見以後、Danzier et al. (1954) と Thibault et al. (1954) は、自然交配させた雌の子

宮から回収した精子を用いてウサギ卵子の体外受精の成功例を正確な形態観察から証明した。その後 Chang (1959) は、ウサギの体外受精卵を雌体内に移植して初めて産子を得たが、この成功により体外受精卵が正常な発生能力を有することが証明された。さらに、Yanagimachi and Chang (1963, 1964) は、ハムスターの精子と卵子を生体液を含まない化学的成分の明らかな培養液に投入して受精過程の観察を可能にした。以来、多くの研究者によって種々の改変が加えられながら、おもにゲッ歯類を中心とした多くの哺乳動物について体外受精の成功例が報告され (Rogers, 1978, 豊田, 1979), 受精のメカニズムを理解するために不可欠の研究手段となっている。しかし、ウシやブタなどの大型家畜では、実験小動物などのように受精実験に供する新鮮な排卵卵子を手軽にしかも多量にうるることが困難なため、体外受精に関する研究はきわめて少なく (Thibault and Dauzier, 1961; Wright and Bondioli, 1981), と

くに精子の *capacitation* や先体反応と受精との関係について未解決の問題が多く残されている。家畜における体外受精法の確立は、これら大型動物の受精に関わる諸要因の分析に有用であるのみならず、受精卵の体外培養、凍結保存あるいは移植の諸技術と併用することにより、優良な遺伝子を有する卵子の人為的操作が容易となり、経済動物である家畜の改良増殖に大きく貢献するものと考えられる。

本研究では、ウシ、ブタ、ヤギなどの中・大型家畜における体外受精法の確立に寄与することを目的として、まず実験小動物とくにハムスターの透明帯除去卵子を用いて1,2の家畜精子の侵入の有無を調べて、これらの精子の *capacitation* や先体反応の誘起に必要な条件を間接的に検討した。

また、ハムスターは実験用小哺乳動物として体外受精の実験に広く用いられているので、この種の卵子について体外受精に関与する諸要因について詳細な検討を加えた。

第 2 章

透明帯除去卵子への家畜精子の侵入条件

第 1 節 緒 言

哺乳動物では、卵子を取りまく透明帯に異種精子の侵入を防ぐ拒否機構があり、一般的には同一種の配偶子間でのみ受精が成立する (Yanagimachi, 1977)。しかし、タンパク分解酵素により透明帯を卵子から取り除くと異種精子の侵入が可能になる (Yanagimachi, 1972a)。さらに、透明帯除去卵子への異種精子の侵入には、精子側でもあらかじめ capacitation や 矢体反応の誘起されていることが必要である (Yanagimachi, 1972a; Barros et al., 1973; Hanada and Chang, 1976a, 1978; Yanagimachi et al., 1976)。

本章では、種々の条件下で前培養することにより家畜精子に誘起された生理学的変化が capacitation と一致する変化が否かを異種動物の透明帯除去卵子を用いて検定した。

第2節 透明帯除去卵子へのブタ精子の侵入

本節では、種々の条件下で前培養したブタ精子のマウス、ラットおよびハムスターの透明帯除去卵子への侵入の可能性について検討した。

I. 実験材料および方法

本実験で用いた精子と卵子の採取から授精までの一連の過程を図1に示した。

1) 培養液

本実験で用いた培養液は Toyoda and Chang (1974) がラット卵子の体外受精用に作成した修正 Krebs-Ringer bicarbonate (m-KRB) 液である。その成分を表1に示す。無機塩類、エネルギー源およびウシ血清アルブミン (BSA) (crystallized and lyophilized: Sigma Chem. Co.) などから成り、pH指示薬としてフェノールレッドを添加した。この培養液は、37°C、5%炭酸ガスと95%空気の気相下で pH 7.4 を示し、Biggers

TREATMENT OF SPEPMATOZOA

TREATMENT OF EGGS

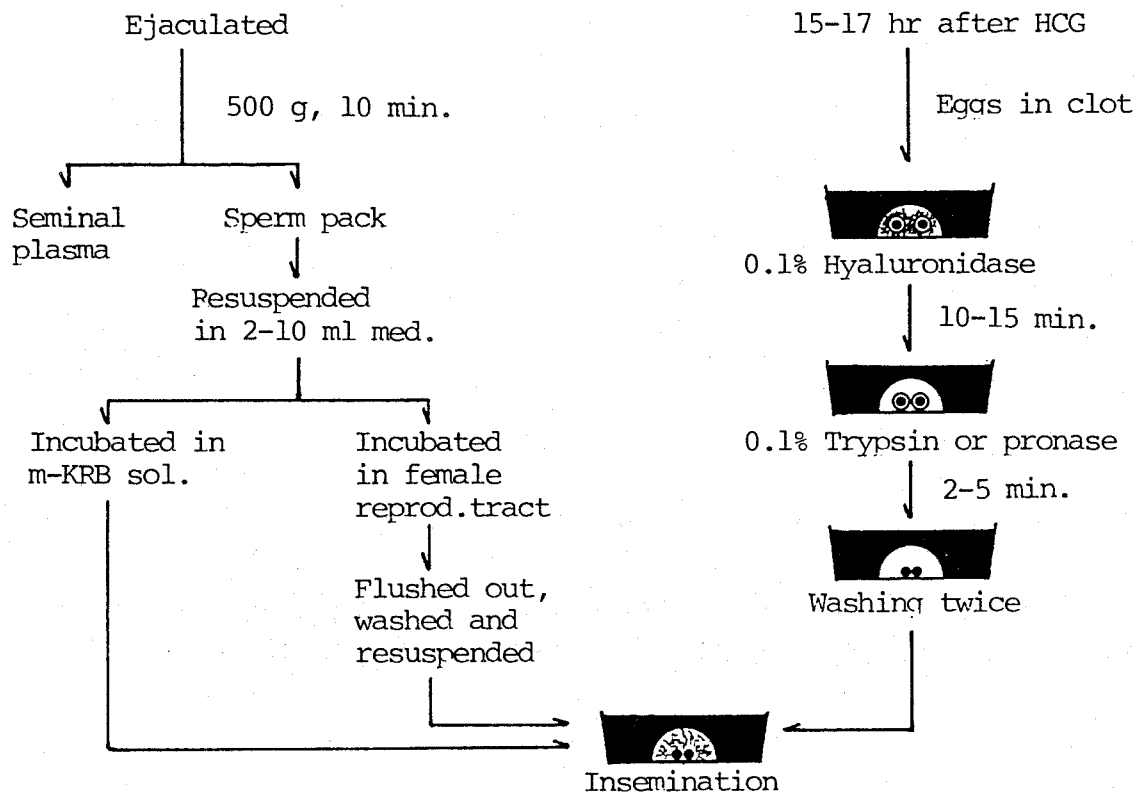


FIG 1
EXPERIMENTAL PROCEDURES

TABLE 1

COMPOSITION OF m-KRB SOLUTION

Component	mM
NaCl	94.60
KCl	4.78
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.71
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.19
KH ₂ PO ₄	1.19
NaHCO ₃	25.07
Glucose	5.56
Na-pyruvate	0.50
Na-lactate	21.58
Streptomycin	50µg/ml
Penicillin	75µg/ml
BSA*	4mg/ml
Phenol red	2µg/ml

* Bovine serum albumin

et al. (1971) の算出方法による浸透圧の理論値は 308 mOsmole であり、

2) 精液の採取と精子の前処理

ランドレーヌ種またはハンフシャー種の雄ブタから手圧法により全精液を採取した。二重のガーゼを通して、膠様物を除去した後、約 50 ml の採取精液をただちに m-KRB 液で 2 回洗浄して (500g, 10 分間の遠心分離) 精漿を除去し、再び種々の量 (2-10 ml) の m-KRB 液中に精子を浮遊させた。この精子浮遊液の一部は、後述 (4) 授精を参照) のようにパラフィンオイルでおおった 0.4 ml の m-KRB 液中に少量滴下し、炭酸ガス培養装置内 (37°C, 5% 炭酸ガス + 95% 空気) で 3-8 時間前培養した。残りの精子浮遊液は雌ブタ生殖器道内での培養のために用いた。すなわち、屠場で屠殺直後に、卵巢所見により発情と推定した経産ブタ、あるいは発情周期の未知な性成熟前後の未経産ブタから採取した子宮または卵管内にそれぞれ 0.2-0.5 ml および 0.01-0.1 ml の精子

浮遊液（精子濃度； $2-10 \times 10^8$ 精子/ml）を注入した。注入後，精子の漏出を防ぐために子宮頸部と卵管采の部分を経絡し， 37°C の 0.9% NaCl 液中に入れて 2-10 時間静置した。その後，子宮と卵管をそれぞれ m-KRB 液を用いて灌流して精子を採取した。2 度の遠心分離（ $50g$ ，5 分間 および $500g$ ，10 分間）により回収精子液から生殖器由来の血球や生体液を除去した後，m-KRB 液中に精子を再浮遊させて生殖器内前培養精子として用いた。

3) 卵子の採取と透明帯除去処理

成熟雌ハムスター（2-4 カ月令），幼若雌ラット（Wistar 系：3 週令）および幼若雌マウス（ICR 系：3 週令）に対して表 2 に示すように過排卵誘起処理をした。ハムスターでは粘調性をもった腔垢を確認した日（発情後期）に，PMSG（セトロロピン：帝国臓器）を注射した。いずれの動物種においても，PMSG の注射後 48-52 時間目に HCG（フベローゲン：三共）を注射し，この 15-17 時間後に動物を屠

TABLE 2

METHOD OF INDUCTION OF SUPEROVULATION

Animals	Dose (IU) of gonadotropins		Interval (hr)	Time of killing (hr after HCG)
	PMSG	HCG		
Hamster ¹⁾	20-25 (i.p.)	20-25 (i.p.)	48 - 52	15 - 17
Rat ²⁾	10 (s.c.)	10 (i.p.)	48 - 52	15 - 17
Mouse ³⁾	5 (i.p.)	5 (i.p.)	48 - 50	15 - 16

Abbreviation: IU, international unit; i.p., intraperitoneal; s.c., subcutaneous.

1) Yanagimachi and Chang (1964); 2) Niwa and Chang (1973); 3) Iwamatsu and Chang (1969).

殺した。この処理により1頭の雌から平均30-50個の排卵卵子を得ることができた。これらの卵子は、ただちにパラフィンオイルでおおった0.5mlの0.1%ヒアルロニダーゼ(Type IV: Sigma Chem. Co.)を含むm-KRB液中で10-15分間処理した。顆粒膜細胞が卵子から十分に離散した後、マウスとラットでは卵子を0.1%のフロネース(料研科学)、ハムスター卵子ではトリプシン(Type III: Sigma Chem. Co.; Boehringer Mannheim Co.)溶液中に移して2-5分間処理して透明帯を除去した。透明帯除去卵子は、パラフィンオイルでおおった0.5mlのm-KRB液中に二度移し替えをすることにより洗浄して授精用卵子として用いた。

4) 授 精

滅菌済みのプラスチック製培養皿(3×11mm: 豊島製作所)の中央部に滴下した0.4mlのm-KRB液のまわりを低粘度のパラフィンオイル(アミノ酸分析用: 半井化学)でおおった。授精にさきだって、培養皿を炭酸ガス培養装

置内 (37°C , 5% 炭酸ガス + 95% 空気) に静置し, m-KRB 液の温度と気相を培養器内環境のそれと充分に平衡させた。授精は, あらかじめ 0.4ml の m-KRB 液中で前培養しておいた精子浮遊液中に透明帯除去卵子をガラス細管を用いて導入するか, 透明帯除去卵子を含む 0.4ml の m-KRB 液中に雌性生殖器内で前培養後回収した精子浮遊液 ($10-50\mu\text{l}$) をマイクロピペット (エッペンドルフ) を用いて注入しておこなった。授精後, ただちに培養皿を炭酸ガス培養装置内に入れ, 種々の時間 ($1-8.5$ 時間) 培養した。

5) 卵子の固定, 染色および検査

培養終了後, 培養液中から卵子を取り出し, 時計皿内の約 1ml の m-KRB 液中で洗浄しながら周囲に付着した精子を可能なかぎり取り除いた。ついで, 4 点のワセリンスポットを配したスライドガラスの中央に滴下した卵子をカバーガラスで静かに圧した。この標本を 10% 中性ホルマリン中で一昼夜固定し, 0.25% アセ

トラフモイドで数分間染色した後 (Chang, 1952), 卵子への精子侵入の有無を位相差顕微鏡下で観察した。精子尾部をともなった膨化精子頭部あるいは雄性前核が細胞質内に認められる卵子を精子侵入卵と判定した。また, 精子侵入卵のうち染色体が才2成熟分裂後期から才2極体放出の時期にある卵子を賦活化卵子として分類した。

II. 実験結果

m-KRB 液中で前培養した精子による透明帯除去卵子への侵入

ブタ精子を m-KRB 液中で前培養 (3-8 時間) 後, ハムスター, ラットおよびマウスの透明帯除去卵子に授精すると, その直後から卵細胞質表面に精子の接着が認められ, とくにハムスター卵子ではきわめて多数の精子の付着が観察された。しかし, 授精後 7-8 時間で検査してもハムスター (図. 2, a) とラット卵子でそれぞれ1個ずつの精子侵入卵が認められ

たにすぎなかった（表3）。

雌ブタ生殖器内で前培養した精子による透明帯除去卵子への侵入

予備実験で、発情経産あるいは未経産雌ブタの子宮と卵管内で4-10時間前培養した精子によりハムスターとラットの透明帯除去卵子に授精後、7-8.5時間目に検査した。その結果、表4に示すように、ハムスター卵子では10-36%の精子侵入率が得られたが（図2, bとc）、ラット卵子では0-3%の侵入率が得られたにすぎない（図2, d）。ハムスター卵子の場合、経産ブタ（10-12%）よりも未経産ブタ（23-36%）の生殖器内で培養した精子による方が精子侵入率が高かった。

透明帯除去ハムスター卵子への侵入に必要なブタ精子の生理的变化に要する時間

前述の実験（表3と4）では、用いた前培養時間（3-10時間）や精子濃度（ $0.01-11.1 \times 10^6$

TABLE 3
 PENETRATION OF ZONA-FREE EGGS FROM DIFFERENT SPECIES
 BY BOAR EJACULATED SPERMATOZOA PREINCUBATED
 IN A CHEMICALLY DEFINED MEDIUM

Eggs of	No. of eggs examined*	No. of eggs penetrated (%)
Hamster	53	1 (2)
Rat	45	1 (2)
Mouse	41	0 (0)

Spermatozoa preincubated for 3-8 hr in a m-KRB medium were used for insemination ($0.06-4.9 \times 10^6$ sperm/ml).

* Eggs were examined 7-8 hr after insemination.

TABLE 4

PENETRATION OF ZONA-FREE EGGS FROM DIFFERENT SPECIES BY BOAR EJACULATED SPERMATOZOA PREINCUBATED IN THE REPRODUCTIVE TRACT ISOLATED FROM OESTROUS SOW OR MATURING GILT

Eggs of	Preincubated in gilt or sow tract	Spermatozoa preincubated in	Period of sperm preincubation (hr)	Sperm conc. at insemination ($\times 10^6/\text{ml}$)	No. of eggs penetrated/ no. of eggs examined (%)
Hamster	Gilt	Uterus and oviduct*	7.5	0.3	5/14 (36)
		Uterus	4 - 10	0.01 - 4.9	19/58 (33)
		Oviduct	4 - 10	0.01 - 10.5	15/65 (23)
	Sow	Uterus	4 - 6.5	4.0 - 11.1	5/43 (12)
		Oviduct	6.5	6.9	3/31 (10)
Rat	Gilt or sow	Uterus	8	0.01 - 0.04	0/56 (0)
		Oviduct	6 - 8	0.01 - 6.9	3/99 (3)

* Spermatozoa recovered from the uterus and oviduct were used after mixing.

精子/ml)にきわめて大きな変異があったが、
未經産雌ブタの生殖器内で前培養した精子が
かなり高率にハムスターの透明帯除去卵子に
侵入しうることが知られたので、より限定し
た条件下で系統的な実験を試みた。未經産雌
ブタの子宮と卵管でそれぞれ2時間から経時
的に5.5時間まで前培養した精子を $0.2-3.7 \times 10^6$ 精子/mlの濃度で透明帯除去ハムスター卵子
に授精し、その後1-7時間後に至るまで経時
的な侵入率の変化を調べた。その結果、表5
に示すように、子宮および卵管での前培養精
子のいずれにおいても、前培養時間と授精後
の培養時間の増加とともに精子侵入率は
高くなった。すなわち、2-3.5時間の前培養精
子では、授精後7時間目においても18%（卵
管培養精子）から37%（子宮培養精子）の精
子侵入率が得られた。精子の前培養に用いた
雌性生殖器の部位、すなわち子宮と卵管を比
較すると、前者から回収した精子において常
に高い侵入率が得られた。また、5-5.5時間の

TABLE 5
PENETRATION OF ZONA-FREE HAMSTER EGGS IN VITRO BY BOAR EJACULATED SPERMATOZOA PREINCUBATED
IN THE REPRODUCTIVE TRACT ISOLATED FROM A MATURING GILT

Duration of pre- incubation (hr)	Time of examination (hr after insem.)	Condition of sperm preincubation			
		Uterus		Oviduct	
		No. of eggs penetrated/ no. examined (%)	No. of eggs activated/ no. penetrated (%)	No. of eggs penetrated/ no. examined (%)	No. of eggs activated/ no. penetrated (%)
2	4	0+ 0*/47(0)	-	1+ 0*/46(2)	0/ 1(0)
	5	1+ 0 /46(2)	0/ 1(0)	1+ 0 /43(2)	0/ 1(0)
	7	2+ 0 /45(4)	0/ 2(0)	4+ 0 /36(11)	1/ 4(25)
3-3.5	2	0+ 0 /41(0)	-	0+ 0 /48(0)	-
	3	0+ 0 /45(0)	-	0+ 0 /44(0)	-
	4	6+ 0 /72(8)	0/ 6(0)	7+ 1 /77(10)	1/ 8(12)
	5	14+ 1 /64(23)	1/15(7)	6+ 0 /43(14)	0/ 6(0)
	7	11+ 1 /33(36)	1/12(8)	7+ 0 /38(18)	0/ 7(0)
4-4.5	1	1+ 0 /55(2)	1/ 1(100)	0+ 0 /56(0)	-
	2	29+ 0 /42(69)	29/29(100)	1+ 0 /69(1)	1/ 1(100)
	3	40+ 3 /45(96)	35/43(81)	0+ 0 /50(0)	-
	4	19+48 /78(86)	59/67(88)	31+ 8 /70(56)	20/39(51)
	5	14+53 /72(93)	62/67(93)	20+14 /71(49)	21/34(62)
5-5.5	7	10+45 /62(85)	46/55(84)	18+ 7 /59(42)	12/25(48)
	1	21+ 0 /46(46)	20/21(95)	3+ 0 /35(9)	3/ 3(100)
	2	37+ 5 /42(100)	42/42(100)	23+ 0 /52(44)	18/23(78)
	3	0+36 /36(100)	36/36(100)	29+ 4 /54(61)	23/33(70)

* The first figure denotes the number of eggs with enlarged sperm head and the second denotes the number of eggs with male pronucleus.

前培養精子を用いた場合、子宮回収精子ではほぼ1時間で卵子への侵入が完了したが、卵管回収精子では精子侵入の完了まで2-3時間を要した。

精子頭部の雄性前核(図2, e)への変形は、未經産卵の子宮内で4-5.5時間前培養された精子を授精した場合に高率に認められ、頭部が膨化してから前核が形成されるまでほぼ1時間を要するものと推定された(表5)。また、これらの卵子のほとんどは多精子侵入卵であった(図2, f)。

授精時に才2成熟分裂の中期(図2, c)にある卵子の染色体は、精子の侵入によって才2成熟分裂後期と終期を経て才2極体を放出したが(図2, dとe)、このような卵子の賦活化率は精子の前培養時間が短い場合や卵管回収精子によって授精した場合には低く、4-5.5時間前培養した子宮回収精子の侵入によってきわめて高くなった(表5)。

ブタ精子が侵入した透明帯除去ハムスター 卵子の発生能

未経産ブタの子宮内で5-5.5時間前培養した精子をハムスター卵子に授精し、授精後3時間目に一部の卵子を検査した。残りの卵子は継続して培養をつづけ授精後25.5時間目に検査した。授精後3時間で検査した24個の卵子はすべて精子侵入卵であったが、そのうち88%は多精子侵入卵であった。授精後25.5時間目には、22個の検査卵のうち8個(36%)が第1分割の中期から終期の段階にあり、4個(18%)が分割していた(図2, 9)。しかし、分割卵のうち3個は一方の割球内に2個の前核を有する異常分割卵であった。

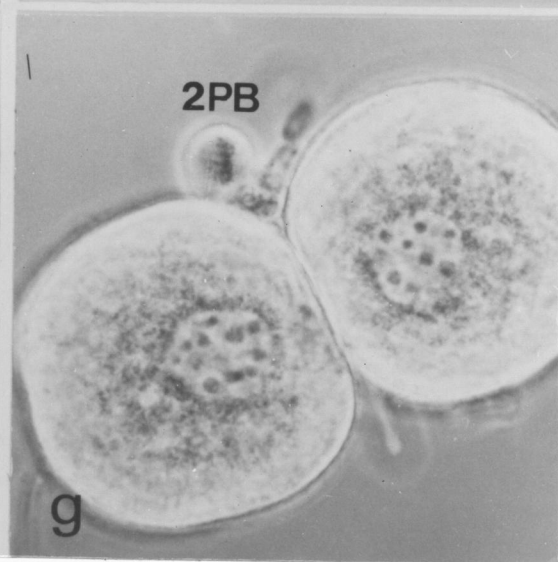
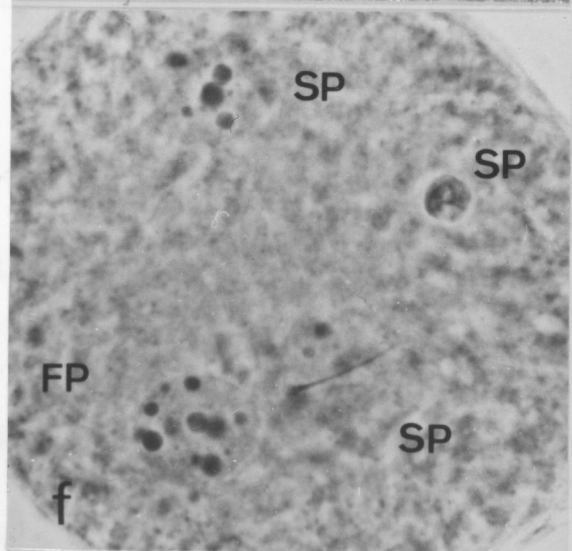
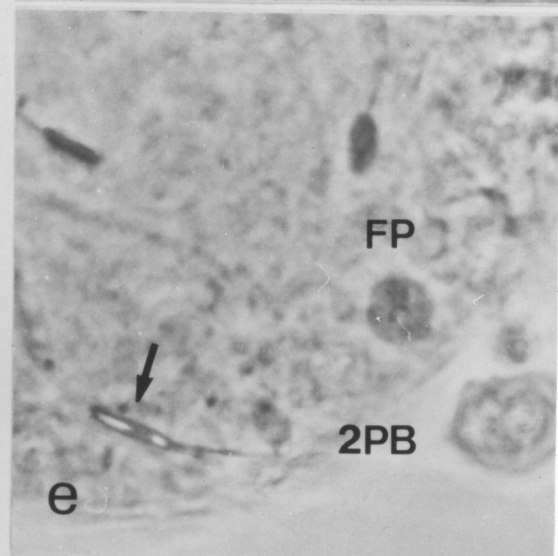
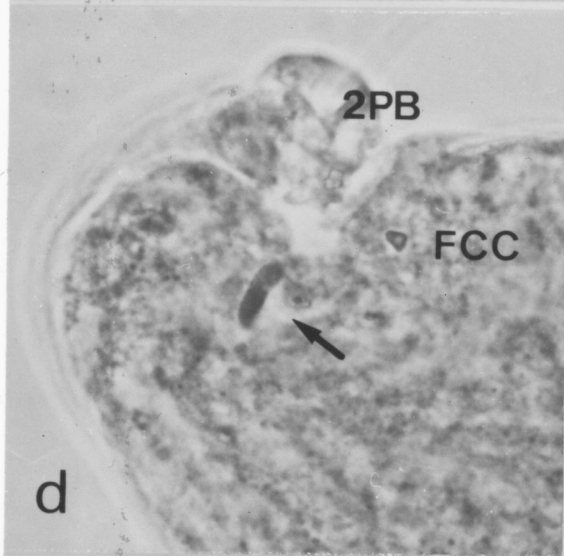
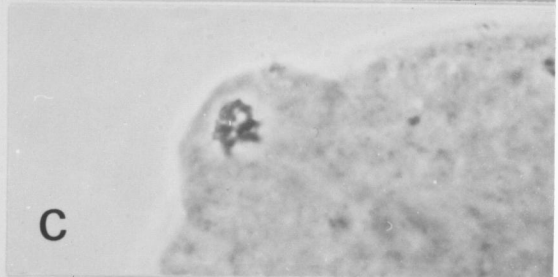
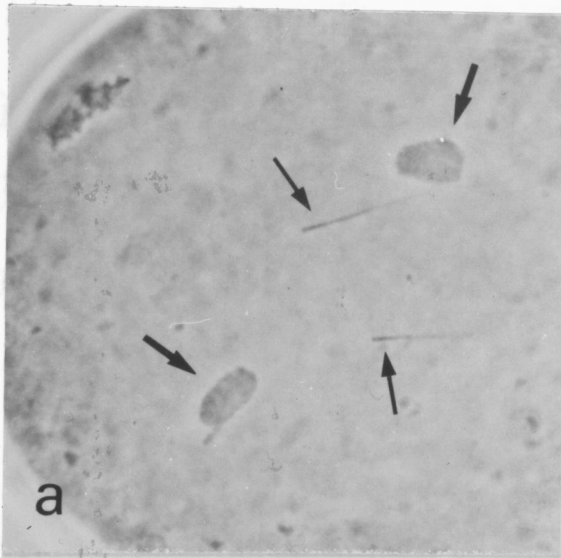
Ⅲ. 考 察

本節における実験結果から、未経産雌ブタの子宮と卵管内でそれぞれ4-4.5および5-5.5時間前培養した精子は、透明帯除去ハムスター卵子に授精後1時間以内に侵入し始めること

FIG. 2

Zona-free hamster and rat eggs penetrated with boar ejaculated spermatozoa and photographed under phase-contrast microscopy after being stained with aceto-lacmoid.

- a). A hamster egg 7.5 hr after insemination with spermatozoa preincubated for 7 hr in m-KRB medium, showing two enlarged sperm heads (large arrows) and egg chromosomes at early anaphase of the second meiotic division. X 870.
- b). and c). A hamster egg 8 hr after insemination with spermatozoa preincubated for 6.5 hr in the uterus of an oestrous sow, showing an enlarged sperm head (b), but egg chromosomes are still unactivated at metaphase of second meiotic division (c). X 800 (b) and X 740 (c).
- d). A rat egg 7 hr after insemination with spermatozoa preincubated for 6 hr in the oviduct of an oestrous sow, showing an enlarged sperm head (large arrow), the female condensed chromatin (FCC) and the second polar body (2PB). Penetrating sperm tail is out of focus. X 670.
- e). A hamster egg 2 hr after insemination with spermatozoa preincubated for 5 hr in the uterus of a maturing gilt, showing a slightly enlarged sperm head (large arrow), female pronucleus (FP) and the second polar body (2PB). X 930.
- f). Polyspermic hamster egg 7.5 hr after insemination with spermatozoa preincubated for 4 hr in the uterus of a maturing gilt, showing three sperm pronuclei (SP) and one female pronucleus (FP). One penetrating sperm tail is visible, but the other two are out of focus. X 800.
- g). A cleaved hamster egg 25.5 hr after insemination with spermatozoa preincubated for 5.5 hr in the uterus of a maturing gilt, showing morphologically normal pronucleus in each blastomere and the second polar body (2PB). X 800.



Excitation of the ...

が明らかとなった。この場合、授精後の時間の経過にともなって精子侵入率は高まったが、前培養時間が2-3.5時間と短い場合には、精子と卵子を長時間培養しても精子侵入率は低率であった(表5)。これらのことから、ブタ精子がハムスター卵子に侵入するのに必要な種の生理学的変化が、雌性生殖器官内で精子を4-5.5時間前培養することによって誘起されたことを示唆している。この生理学的変化が、ブタ精子の *capacitation*、すなわち *intact* なブタ卵子への侵入に必要な生理学的変化と一致するか否かについてはブタ卵子を用いた実験結果と対比して推定する必要がある。しかし、透明帯除去卵子への同種精子 (Yanagimachi and Noda, 1970a; Niwa and Chang, 1975; Noda and Yanagimachi, 1976; Wolf et al., 1976) および異種精子 (Yanagimachi, 1972a; Barros et al., 1973; Hanada and Chang, 1976a, 1978; Yanagimachi et al., 1976; Pavlok, 1981) の侵入にも精子の *capacitation* が必要であることが知られている

ので、本実験で雌性生殖器官内で4-5.5時間前培養されたブタ精子には capacitation あるいは先体反応様の変化が誘起された可能性が示唆される。一方、m-KRB液中で同様の生理学的変化をブタ精子に誘起させるのは、本実験条件下では困難であると思われる。m-KRB液中で3-8時間前培養した精子を用いて、ハムスターとラットにおいてそれぞれわずか1個(2%)の卵子に精子侵入が認められたにすぎなかった(表3)。最近、より組成の複雑な培養液(TC199)を用いてブタ精子を前培養することによって、ブタとハムスターの透明帯除去卵にそれぞれ侵入しうるようになることが報告されたが(Pavlok, 1981)、この実験では前培養時の精子濃度がきわめて高く($1.0-1.4 \times 10^6$ 精子/ml)、死滅精子から滲出する何らかの物質が精子よりもむしろ卵子の膜に何らかの影響を及べて、卵子が精子の侵入を単に物理的に許容しうるような状態になった可能性もあり、さらに検討を要する。

交配から受精に至るまでの体内における詳細な研究によれば (Hunter, 1981), 交配後30分には精子はすでに卵管に到達しており, 1-2時間後にはほとんどの卵子は受精していた。したがって, 体内でのブタ精子の *capacitation* に要する時間は1-2時間以内と推定された。一方, ブタ精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入に必要なウサギ子宮内での前培養時間は約3時間であることが報告されている (Hanada and Nagase, 1981)。本実験においては, これらより長い時間 (4-5.5時間) 子宮あるいは卵管で培養することによりはじめて高率に透明帯除去ハムスター卵子に侵入できるようになったが, これは性成熟に達しつつある未経産ブタの雌性生殖器が使用されたためと考えられ, おそらく雌ブタの子宮環境を支配する卵巣ホルモンの条件によって精子の *capacitation* 誘起の効率が影響をうける可能性もある。また Hunter (1981) の実験では, 精子は生体内で子宮から卵管へと両者を上走した精子であ

り、両者の *capacitation* に対する相乗効果が出ているものと考えられ、このことは、ウサギ (Adams and Chang, 1962 a; Chang and Hunt, 1968) やブタ (Hunter and Hall, 1974) の実験でも知られている。すなわち、子宮と卵管でそれぞれ単独に前培養した精子では *capacitation* に要する時間は遅延し (Bedford, 1970; Chang and Hunter, 1975)、この場合、*capacitation* は卵管より子宮においてより有効に誘起されることも知られている (Adams and Chang, 1962 b)。本実験においても透明帯除去ハムスター卵子への精子侵入は、卵管よりモ子宮回収精子によって高率に認められた。

ハムスター卵子に侵入したブタ精子は、異種細胞質内で膨化し、引き続いて雄性前核を形成する。その前核の形態はハムスター卵子に侵入したハムスター精子由来の前核 (Austin, 1956) と似ており (図 2, +)、ブタ精子がブタ卵子に侵入した場合の前核 (Hunter, 1972) と形態が異なっていた。これは卵子の固定法(ホ

ルマリニンが酢酸エタノール)の違いに起因するのかもしれないが(Pavlok, 1980, 1981), おそらく卵細胞質自体に精子前核の形態を決定する何らかの因子が存在する可能性もある。一方, 卵子は賦活化して才2極体を放出したが, これらの形態的な諸変化は一般的な同種の受精過程と変わるところはなかった。また, 透明帯を除去しているために多精子侵入卵が高率にみられたが, 同様の現象はハムスター卵子内に侵入したヒト精子(Yanagimachi et al., 1976)においてもみられている。異種精子が侵入した透明帯除去卵子の培養をさらに継続すると, 2細胞期にまで発生することが報告されているが(Yanagimachi, 1978), 本実験においても侵入卵の55%において才1分割の中期から2細胞期への発生が認められた。これらのことから, 受精卵の入手が困難な動物種における卵子の代りにハムスター卵子を用いてヒトやブタ精子の梁色体分析の可能性も示唆された(Rudak et al., 1978)。

IV. 摘 要

実験用小哺乳動物の透明帯除去卵子を用いて、ブタ精子の侵入の可能性を調べるとともに卵子への侵入に必要な精子の生理学的変化に要する時間の推定を試みた。得られた結果は下記のとおりである。

1. m-KRB 液中で前培養した精子を用いた場合、透明帯を除去したハムスターおよびラット卵子に対してわずか2%の割合で精子侵入が認められたにすぎず、本実験条件下ではm-KRB液中でのブタ精子のcapacitationを誘起するのはさきわめて困難であると考えられる。

2. 屠場で採取した雌ブタ生殖器内で前培養した精子は、ハムスター卵子に高率に侵入したが、ラット卵子にはほとんど侵入しなかった。

3. 未経産雌ブタの子宮あるいは卵管内で4-5.5時間前培養した精子は高率にハムスター卵子内に侵入したので、本実験条件下でブタ精子に何らかの生理学的変化がもたらされた

ものと考えられる。また、この変化は卵管より子宮内でより有効に誘起された。

4. ハムスター-卵子に侵入したブタ精子頭部は、膨化を経て雄性前核にまで変形したが、雄性前核の形態はハムスター-卵子内におけるハムスター-精子由来のそれと似ていた。精子頭部の変形にともなって、卵子も賦活化し、 α 2極体の放出がみられた。その後、培養を継続した結果、侵入卵のうち55%の卵子では α 1分割の中期から2細胞期にまで発生した。

5. 以上のことから、透明帯除去ハムスター-卵子を用いて、ブタ精子がブタ卵子に侵入する前に誘起されねばならない生理学的変化 (capacitation) の検定が可能であると考えられた。

第3節 透明帯除去ハムスター卵子への侵入に必要なブタ精子の生理学的変化と capacitation との関係

前節において、雌ブタの生殖器内でブタ精子を一定時間前培養することにより、精子にある種の生理学的変化が誘起され、ハムスターの透明帯除去卵子に侵入しうるようになることを明らかにした。レカレ、この生理学的変化がブタ卵子への侵入に必要な capacitation と一致するかどうかは不明であった。Iritani et al. (1978) は、発情経産雌ブタの子宮あるいは卵管で4-5.5時間前培養したブタ精子が、体外で成熟させたブタ卵胞卵内に侵入しうることを報告しているため、本節では、Iritani et al. (1978) が用いたと同じ方法で capacitation を誘起したブタ精子が透明帯除去ハムスター卵子に侵入しうるかどうかを検討した。

I. 実験材料および方法

精液の採取と精子の前処理方法は、すでに
才2節に述べた実験で用いた方法と同じであ
る。すなわち、2頭のランドレース種雄ブタ
から射出精子を採取し、発情経産ブタの子宮
ありいは卵管内でそれぞれ4-5.5時間前培養
した。

雌性生殖器官内で前培養後回収したブタ精子
は、才2節で述べた要領で透明帯除去処理し
たハムスター卵子に授精した。授精時の精子
濃度は $0.1-1.8 \times 10^6$ 精子/ml であり、授精後、各
培養皿を炭酸ガス培養装置内で2-7時間培養
した。

培養終了後、ハムスター卵子は才2節で述
べた方法にしたがって固定・染色した。卵子
への精子侵入の有無は、才2節の方法にした
がって位相差顕微鏡下で判定した。

II. 実験結果

発情経産ブタの雌性生殖器官内で前培養した
精子をハムスター卵子に授精した結果を表6

TABLE 6
PENETRATION OF ZONA-FREE HAMSTER EGGS IN VITRO BY BOAR EJACULATED SPERMATOZOA
PREINCUBATED IN THE REPRODUCTIVE TRACT ISOLATED FROM AN OESTROUS SOW

Duration of pre-incubation (hr)	Time of examination (hr after insemin.)	Condition of sperm preincubation			
		Uterus		Oviduct	
		No. of eggs penetrated/ no. examined (%)	No. of eggs activated/ no. penetrated (%)	No. of eggs penetrated/ no. examined (%)	No. of eggs activated/ no. penetrated (%)
4 - 4.5	2	2+0*/32 (2)	0/ 2 (0)	0+0*/35 (0)	-
	3	7+0/33 (21)	0/ 7 (0)	0+0/35 (0)	-
	4	4+0/50 (8)	1/ 4 (25)	0+0/51 (0)	-
	5	9+0/48 (18)	1/ 9 (11)	0+0/54 (0)	-
	7	8+0/51 (16)	4/ 8 (50)	0+0/54 (0)	-
5 - 5.5	4	8+0/31 (26)	1/ 8 (13)	19+1/34 (59)	7/20 (35)
	5	12+0/46 (26)	2/12 (17)	19+1/45 (44)	4/20 (20)
	7	21+0/48 (44)	1/21 (5)	18+5/40 (58)	5/23 (22)

Sperm concentration at insemination was $0.1-1.8 \times 10^6$ sperm/ml.

* The first figure denotes the number of eggs with enlarged sperm head and the second denotes the number of eggs with male pronucleus.

に示した。子宮内で4-4.5時間前培養した精子によって侵入卵が認められたが、授精後の培養時間を延長しても侵入率は増加しなかった。比較的高い侵入率の得られたのは子宮(26-44%)と卵管(44-59%)内であって、それぞれ5-5.5時間前培養した精子によって得られた。しかし、膨化精子頭部の雄性前核への変形や侵入卵の賦活化率は全般的に低率であった。

Ⅲ、 考 察

オ2節で述べた実験では、透明帯除きハムスター卵子への精子侵入率は、未経産ブタよりも発情経産ブタの雌性生殖器官内で前培養した精子による方が低かったが、本節の実験においても、発情経産ブタの雌性生殖器官内で5-5.5時間前培養された精子による透明帯除きハムスター卵子の侵入率(表6)は、前節の未経産ブタの雌性生殖器官内で前培養された精子による侵入率(表5)と比較して明らかに低かった。しかし、このような不利な条件でも、

低率ながら、体外で培養成熟させたブタ卵胞卵に侵入し得たことが報告されているので (Iritani et al., 1978), ハムスター卵子への侵入に先立って誘起されたブタ精子の生理学的変化は、ブタ卵胞卵への侵入に必要な条件 (capacitation) を満たしている可能性があると考えられた。

これまでの実験結果から、生理学的には最適と考えられる発情経産ブタの雌性生殖器内でブタ精子を前培養しても capacitation が十分に誘起されないと考えられるが、その理由については現在のところ不明である。経産ブタの場合は、雌性生殖器が拡張してきわめて大きく、時として、子宮や卵管内に異常な分泌物、内膜上皮の細胞破片や白血球が多く貯留している場合があり、人工的に生体から分離した条件下でこのような環境に精子を処理しても、必ずしも正常な生理学的条件が満たされていないが、たことも一つの理由と考えられる。レガレ、少なくとも本実験の結果から、ブタ精

子の *capacitation* の有無をハムスターの透明帯除去卵子を用いて検定しうることが示唆された。

IV. 摘 要

体外で成熟させたブタ卵胞卵に侵入しうるようなブタ精子と同一の前培養条件で処理された精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入の可能性について検討した。

1. 発情経産雌ブタの子宮あるいは卵管で4-5.5時間前培養した精子を透明帯除去ハムスター卵子に授精した結果、0-59%の卵子に精子侵入が認められ、すでに報告されている同一の前培養条件で処理された精子によるブタ卵胞卵の精子侵入卵率(10-26%)とほぼ一致した。

2. 透明帯除去ハムスター卵子の侵入卵率から比較すると、経産ブタより未経産ブタの生殖器内で、また卵管より子宮で前培養したとき、それぞれより効率的に精子の *capacitation*

が誘起されたと考えられた。

3. 以上のことから、新鮮なブタ排卵卵子の代りに透明帯を除去したハムスター卵子を用いてブタ精子の capacitation に必要な条件や受精の初期過程を検討することができると考えられる。

第4節 透明帯除去卵子へのウシ精子の侵入

これまでの実験で、ブタ精子が同種の卵子に侵入するのに必要な *capacitation* の誘起を検定するために、異種動物、とくにハムスターの透明帯除去卵子を代用できるか否かについて検討した。ウシにおいては、すでに体外培養後の卵胞卵を用いて、ウシ(3-4時間)あるいはウサギ(12-14時間)の雌性生殖器官内で前培養された精子が体外で卵胞卵内に侵入レウることが報告されており (Iritani and Niwa, 1977), さらに、ウサギの子宮内で前培養されたウシ精子が透明帯除去ハムスター卵子に侵入レウることも報告されている (Hanada and Nagase, 1981)。しかし、上記の2つの実験は、それぞれ異なる研究者により行われたものであり、実験の方法も異なっているので、ウシの卵子に侵入するために必要な条件が、透明帯除去ハムスター卵子に侵入するための条件と一致しているか否かは不明である。そこで、本節

では Iritani and Niwa (1977) が用いたと同じ方法で capacitation を誘起したウシ精子が透明帯除去異種動物卵子に侵入しうるかが否かを検討し、さらに単純な組成からなる培養液中でのウシ精子の capacitation の誘起の可能性を検討した。

I. 実験材料および方法

精液の採取と精子の前処理，ならびに授精の方法は，すでに本章のオ2節に述べた実験で用いた方法と同じである。すなわち，黒毛和種の雄ウシから射出精子を採取し，m-KRB 液中に浮遊させた 0.3ml の精子液を発情未經産雌ウシから単離した子宮内で 2-8.5 時間前培養した。また，精子浮遊液の一部は m-KRB 液中での前培養にも用いた。一方，射出精子と比較するため，屠場で屠殺直後の雄ウシ精巢上体尾部から灌流圧出して採取した精子も用いた。少量の m-KRB 液中に浮遊させた精子液の一部を射出精子の場合と同様に m-KRB 液中 (0-5 時間) あるいは発情未經産雌ウシの単離

子宮内（5時間）で前培養した。

ウシ子宮内で前培養後に回収した精子を用いた場合には、透明帯を除去了したハムスター、マウスあるいはラット卵子を含む0.4mlの培養液中に回収精子の一部（5-10 μ l）をマイクロピペットで導入した。また、m-KRB液中で前培養した精子を用いた場合には、逆に前培養精子液中にそれぞれの透明帯除去卵子をガラス細管を用いて導入した。何れの場合も培養皿を炭酸ガス培養装置内（5%炭酸ガス，95%空気，37℃）に静置して種々の時間（3-16時間）卵子と精子を培養した。

培養終了後、卵子を固定・染色して、精子侵入の有無を位相差顕微鏡下で観察した。

なお、雌性生殖器官からの精子の回収方法、卵子からの透明帯除去方法および卵子の固定・染色法はすべて、本章の第2節で述べた方法に準じた。

II. 実験結果

ウシ射出精子を m-KRB 液中で 3-9 時間前培養後に、ハムスター、マウスおよびラットの透明帯除去卵子に授精した結果、表 7 に示すように、授精後 7-16 時間をへても卵子への精子侵入は全く認められなかった。一方、m-KRB 液中で 0-5 時間前培養した精巢上体精子を透明帯除去ハムスター卵子に授精した結果、表 8 に示すように、前培養を全く行わずに精子を直ちに授精に用いたとき、授精 4-8 時間後には侵入卵は得られなかったが、授精 16 時間後には 15% ($3/20$) の卵子に精子侵入が認められた (図 3, a と b)。さらに、精子を 5 時間前培養すると授精 8 時間後には 14% ($6/44$) の卵子に精子侵入が認められた (図 3, c, d と e)。

射出精子あるいは精巢上体精子をそれぞれウシの単離子宮内で 2-8.5 時間前培養後に回収した精子を用いて、ハムスター、マウスあるいはラットの透明帯除去卵子に授精した結果を表 9 に示した。精巢上体精子を 5 時間子宮内で前培養し、授精の 3, 7 および 16 時間後に

TABLE 7

PENETRATION OF ZONA-FREE EGGS FROM DIFFERENT SPECIES BY BULL
EJACULATED SPERMATOZOA PREINCUBATED IN A CHEMICALLY DEFINED MEDIUM

Eggs of	No. of eggs examined*	No. of eggs penetrated (%)
Hamster	63	0 (0)
Rat	60	0 (0)
Mouse	76	0 (0)

Spermatozoa preincubated for 3-9 hr in a m-KRB medium
were used for insemination ($0.2-3.8 \times 10^6$ sperm/ml).

* Eggs were examined 7-16 hr after insemination.

TABLE 8

PENETRATION OF ZONA-FREE HAMSTER EGGS BY BULL EPIDIDYMAL SPERMATOZOA PREINCUBATED IN A CHEMICALLY DEFINED MEDIUM

Duration of preincubation (hr)	Time of examination (hr after insemin.)	No. of eggs examined	No. of eggs penetrated (%)	No. of eggs activated (%)
0	4 - 8	69	0+0/69 (0)	-
0	16	20	3+0/20 (15)	0 (0)
5	8	44	5+1/44 (14)	5 (83)

Sperm concentration at insemination was $0.82-2.44 \times 10^6$ sperm/ml.

* The first figure denotes the number of eggs with enlarged sperm head and the second denotes the number of eggs with male pronucleus.

TABLE 9

PENETRATION OF ZONA-FREE EGGS FROM DIFFERENT SPECIES BY BULL SPERMATOZOA PREINCUBATED IN THE UTERUS ISOLATED FROM AN OESTROUS COW

Type of sperm	Eggs of	Duration of preincubation (hr)	No. of eggs examined*	No. of eggs penetrated (%)
Ejaculated	Hamster	2 - 4.5	104	0 (0)
	Rat	5.5 - 8.5	37	0 (0)
Epididymal	Hamster	5	89	3 (3)
	Rat	5	46	0 (0)
	Mouse	5	122	0 (0)

Sperm concentration at insemination was $0.01-7.7 \times 10^6$ sperm/ml.

* Eggs were examined 3-16 hr after insemination.

検査した場合には、侵入卵はそれぞれ1個づつ認められたが、射出精子を授精に用いた場合や精巢上体精子をラットおよびマウス卵に授精した場合には侵入卵を得ることはできなかった。

ハムスター卵子内に侵入した精子頭部のほとんどは膨化の状態にとどまっておリ(図3, aとc), 膨化精子頭部の雄性前核への変形(図3, dとe)は1個の卵子で認められたにすぎなかった。精子侵入にともなって卵子の染色体は賦活化されて才2成熟分裂を再開しうろが(図3, d), このような卵子は, m-KRB液中で5時間前培養した精巢上体精子を用いて, 授精8時間後に検査した場合にのみ高率($5/6 = 83\%$)に認められた。また, 本節で得られた侵入卵はすべて単精子による侵入卵であった。

Ⅲ. 考 察

Iritani and Niwa (1977) は, 発情未經産雌ウシ

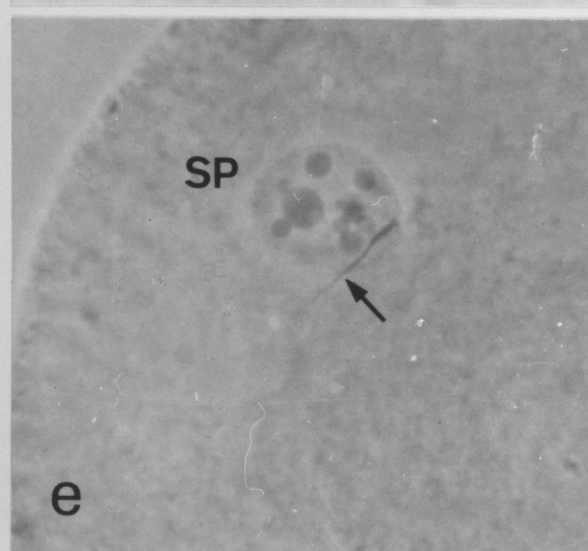
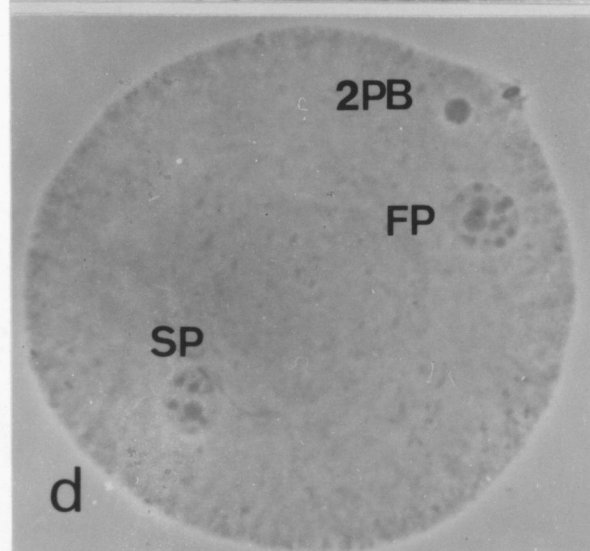
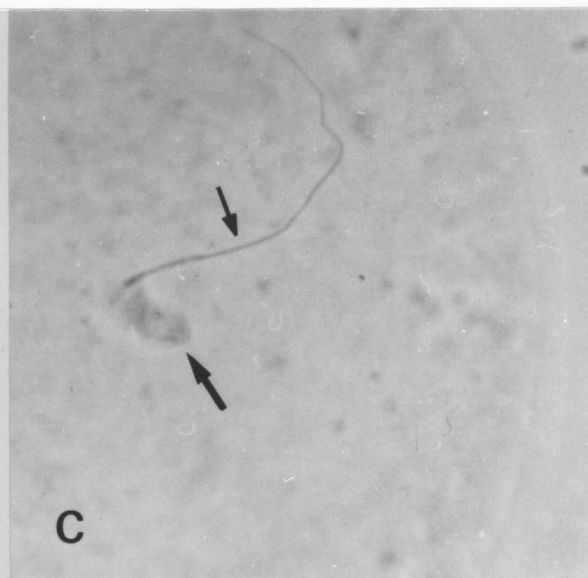
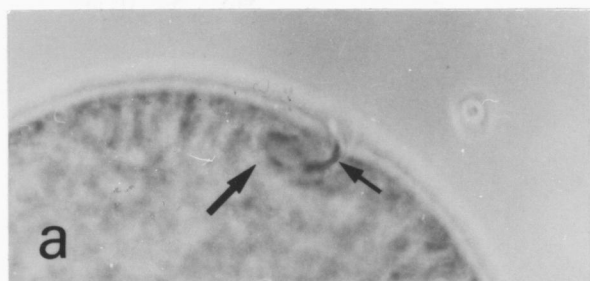
FIG. 3

Zona-free hamster eggs penetrated with bull epididymal spermatozoa and photographed under phase-contrast microscopy after being stained with aceto-lacmoid.

a) and b). A hamster egg penetrated 16 hr after insemination with spermatozoa without preincubation in a m-KRB medium. An enlarged sperm head (large arrow) and its corresponding sperm tail (small arrow) (a) are visible. The egg is not activated and chromosomes are abnormally condensed (b). X 740 (a) and X 680 (b).

c). A hamster egg penetrated 8 hr after insemination with spermatozoa preincubated for 5 hr in a m-KRB medium, showing an enlarged sperm head (large arrow) and its corresponding sperm tail (small arrow). X 800.

d) and e). A hamster egg penetrated 8 hr after insemination with spermatozoa preincubated for 5 hr in a m-KRB medium. Male (SP) and female (FP) pronuclei and the second polar body (2PB) (d) and a penetrating sperm tail (arrow) are visible near the sperm pronucleus (SP) (e). X 420 (d) and X 930 (e).



から単離したウシ射出精子を体外成熟させたウシ卵胞卵に授精して、低率(19-21%)ながら侵入卵を得ているので、この条件下で一部の精子に *capacitation* が誘起されたものと考えられる。しかし、本実験では、同様の処理方法で前培養した射出精子は、透明帯を除去したハムスター卵子に全く侵入しなかった(表9)。このことは、ウシ精子がウシ卵子に侵入する条件を備えていても、そのような精子は必ずしも透明帯除去ハムスター卵子に侵入しえないことを示唆している。しかし、透明帯除去ハムスター卵子に侵入する条件を備えていれば、ウシの卵子にも侵入しうるか否かは本実験の結果からだけでは推察は困難である。精巢上体精子では m-KRB 液(表8)あるいは単離子宮(表9)内での前培養により透明帯除去ハムスター卵子に低率ではあるが侵入しうるようになること(本実験)、またウサギ子宮内で4-6時間前培養されたウシ射出精子をイミダゾールの存在下で透明帯除去ハムスタ

一卵子に授精すると精子侵入率が飛躍的に高まること (Hanada and Nagase, 1981) が知られているので、精子に何らかの生理学的変化が生じない限り透明帯除去ハムスター卵子に侵入しえないことは確実と思われる。現在までに、同じ研究者が、同様に処理したウシ精子を用いて、intactなウシの卵子と透明帯を除去したハムスター卵子に同時に授精するような実験成績は見当たらないが、高浸透圧 (380 mOsmole) の塩溶液と加熱処理後のウシ卵胞液中でウシ精子を短時間処理することにより、intactなウシ卵子 (Brackett et al., 1980) にも透明帯除去ハムスター卵子 (Lorton and First, 1979) にも侵入できるようになることが報告されている。

単純な組成から成る培養液 (m-KRB) 中で5時間前培養したウシ精巢上体精子は、8時間後に、また、前培養を全く行わなかった精子では、授精後16時間でそれぞれ14%と16%の透明帯除去ハムスター卵子に侵入した (表8)。さらに、組織培養液 (TC 199) 中で5時間前培

養した精巢上体精子を透明帯除去ウシ卵胞卵に授精して、12-14時間後に高率(89%)の侵入卵が得られている(Fulka et al., 1982)。したがって、精巢上体精子は射出精子に比較してより容易に何らかの生理学的変化が誘起されるものと考えられる。この生理学的変化がウシ精子の *capacitation* と一致するかどうかは不明であるが、射出精子の細胞膜は精漿由来の一種の糖タンパク質でおおわれており(Bedford, 1970; Chang and Hunter, 1975)、精子の *capacitation* とは、一部にはこのタンパク質が取り除かれることであることが知られているので(Weinman and Williams, 1964; Johnson and Hunter, 1972)、精漿にさらされていない精巢上体精子では *capacitation* あるいは類似の生理学的変化がより簡単に誘起されることは容易に推察される。

透明帯除去ハムスター卵子に侵入した精子頭部の前核への変形はわずか1個の侵入卵においてのみ認められた。この雄性前核は、第2節(図2, f)で述べたブタ精子由来の前核

と全く同様な形態を有していた。また、侵入卵子の染色体の賦活化は、m-KRB液中で5時間前培養された精巢上体精子を用いて授精8時間後に得られた侵入卵において高率(83%)に認められたので、正常な時間の範囲内で精子侵入のみられたハムスター卵子は、ウシ精子により容易に賦活化されるものと考えられる。

本実験では、透明帯除去卵子へのウシ精子の侵入は、ハムスター卵子にのみ認められ、マウスやラット卵子への侵入は全く認められなかった。すでに本章のオ2節で述べたように、ブタおよびヤギの精子においてもマウスやラットの透明帯除去卵子への侵入はきわめて困難であった。また、ヒト精子もマウスやラットの透明帯除去卵子には侵入しないことが報告されている(Quinn, 1979; Paulok, 1980)。精子侵入に対する種特異性はまず透明帯で発揮されるが(Yanagimachi, 1977)、透明帯を取り除いてもマウスやラット卵子の細胞膜

には侵入精子を選抜する機構があり、ハムスター卵子ではこの種の種特異性が弱い、欠けていると思われる。事実、多くの異種動物精子が透明帯を除いたハムスター卵子に侵入しうることが知られている (Yanagimachi, 1981)。

最近、ヒトにおいて男性不妊症判定のための精子の受精能力検定が透明帯除去ハムスター卵子を用いて行われているが (Barros et al., 1978; Rogers et al., 1979), 本実験では、ウシ精子においても同様の検定が可能か否かについての明白な証拠は得られなかった。しかし、精巢上体精子が侵入しうるようになることと、上記の文献的考察から類推すれば、ウシにおいても精子の受精能力検定に透明帯除去ハムスター卵子が利用しうる可能性があると考えられる。

IV. 摘 要

ウシ精子の透明帯除去異種動物卵子への侵入の可能性について検討し、つぎのような結

果が得られた。

1. 射出精子をウシの単離子宮内(2-8.5時間)あるいはm-KRB液中(3-9時間)で前培養後に前者はハムスターとラット, 後者はハムスター, マウスおよびラットのそれぞれ透明帯除去卵子に授精したが, 侵入卵は全く認められなかった。

2. 同様に精巢上体精子をウシの単離子宮内で5時間前培養した場合, ラットとマウスの透明帯除去卵子には全く侵入しなかったが, ハムスター-卵子では89個中3個(3%)に精子侵入が認められた。また, 前培養することなしに, 精子をm-KRB液中で透明帯除去ハムスター-卵子に授精した結果, 16時間後に15%の侵入卵率が得られた。さらに, m-KRB液中で5時間前培養後に授精した結果, 8時間後にやはり14%の侵入卵率が得られた。

3. 上記の結果から, intactなウシ卵子に侵入しうるような精子が必ずしも透明帯除去ハムスター-卵子にも侵入しうるとは限らないこ

とが推察されたが、今後、ウシ精子の *capacitation* をさらに効率良く誘起できる条件が明らかになれば、ウシ精子の受精能を検定するためにハムスターの透明帯除き卵子が有効に利用される可能性のあることも示唆された。

第5節

小 括

本章では、大型家畜における精子の受精能の簡易検定法の開発を目的として、まず実験用小哺乳動物の透明帯除去卵子を用いて家畜精子との間で体外受精を試み、ついでこの方法の有効性を検定するために家畜卵胞卵について、本実験で前処理されたと同一条件で行なわれた体外受精成績と対比して検討した。得られた結果は下記の通りである。

1. 種々の前処理をされたブタおよびウシの精子をハムスター、マウスおよびラットの透明帯除去卵子に授精した結果、何れの精子も、マウスとラットの卵子への侵入はきわめて困難であったが、ハムスター卵子では比較的高い侵入率が得られた。したがって、家畜精子の受精能の検定には、透明帯除去ハムスター卵子が最も有用であることが示唆された。

2. 未經産雌ブタ生殖器内（子宮、卵管）

で前培養されたブタ射出精子は、透明帯除去ハムスター卵子に高率に侵入し、体外培養後のブタの成熟卵胞卵にも侵入しえた成績にも付合し、ブタ精子の *capacitation* の有無はハムスター卵子を代用してある程度検定しうるということが明らかにされた。この方法により、ブタ精子の *capacitation* の誘起に要する時間は未経産雌ブタ子宮内で4-5.5時間であると推察された。

3. ウシの射出精子あるいは精巢上体精子をウシ子宮内で2-8.5時間前培養後に透明帯除去ハムスター卵子に授精した結果、精巢上体精子を使った場合にのみ低率(3%)の侵入卵が認められたにすぎなかった。一方、同じ処理後の射出精子を用いて、*intact* なウシの卵子への精子侵入例が報告されているので、ウシの場合、*capacitation* の誘起された精子が必ずしも透明帯除去ハムスター卵子に侵入しうるとは限らないことが示唆された。しかし、ハムスター卵子に高率に侵入しうるような条件をそなえた精子は *intact* なウシ卵子にも侵入しう

る可能性があると考えられる。

4. バタオヤビウシの射出精子を m-KRB 液中で前培養後に、透明帯除去ハムスター卵子や同種動物の intact な卵胞卵に授精した結果、精子侵入はきわめて困難であった。一方、m-KRB 液中で前培養したウシ精巣上体精子は低率 (14-15%) ながら透明帯除去ハムスター卵子に侵入したので、精子の *capacitation* 類似の生理学的変化は射出精子よりも精巣上体精子の方がより容易に誘起されるものと推察された。

第 3 章

透明帯除去ハムスター卵子内に侵入前後の家畜精子の微細構造的観察

第 1 節 緒 言

Austin (1951) と Chang (1951) によつて発見され、Austin (1952) により *capacitation* と名付けられた精子の生理学的変化は受精にさきだつて必要不可欠な現象と考えられてきた。しかレ、その後、受精直前のハムスター精子頭部の先体に明瞭な形態的变化、すなわち先体反応が誘起されることが知られるに至つて (Austin and Bishop, 1958; Barros et al., 1967), 両者の変化を区別して考える必要が生じてきた (Bedford, 1970)。現在では、多くの哺乳動物種で、先体反応は *capacitation* 誘起後の精子にのみ認められることが知られている (Bedford and Cooper, 1978; Meizel, 1978; Yanagimachi, 1981)。

一方、家畜では精子の *capacitation* を誘起しようとする条件が不明であつたために、*capacitation*

と先体反応との関係や受精時の精子と卵子の相互作用についての観察は現在のところ皆無
といってよい。才2章において、家畜精子は
雌性生殖器官内で一定時間前培養することによ
り何らかの生理学的変化が誘起され、この変
化は透明帯除去ハムスター卵子を用いて検定
しうることを示唆した。しかし、このような
生理学的変化の性質およびハムスターの透明
帯除去卵子への侵入機序については不明であ
る。そこで本章では、雌性生殖器官内で前培養
後回収した家畜精子の形態的变化と透明帯除
去ハムスター卵子へ侵入前後の精子の動態を
透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

第2節 雌性生殖器官内で培養後のブタおよびヤギ精子の微細構造的観察

第2章の第2節および Kim et al (1980) の実験において、ブタやヤギの射出精子は未経産ブタの子宮内で4-5.5時間前培養することにより、透明帯除去ハムスター卵子内に侵入しうるような生理学的変化の誘起されることが明らかにされた。しかし、これらの家畜精子は大きさが小さく、大きな先体をもつハムスターやモルモット精子のように低倍率下で先体反応を観察することは困難である。そこで本節では、雌性生殖器官内から回収後のブタおよびヤギ精子の形態を透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

I. 実験材料および方法

電子顕微鏡用の精子試料として、m-KRB液中と未経産雌ブタ子宮内で5時間前培養後のブタおよびヤギ射出精子を供試した。精子の前処理と処理後の雌性生殖器官からの回収方法

は、第2章の第2節(ブタ)と Kim et al. (1980) (ヤギ) の方法に準じた。すなわち、ランドレース種雄ブタおよびガーネン種雄ヤギから採取した精液を m-KRB 液により2回洗浄後、m-KRB 液中に再浮遊させ、その一部を炭酸ガス培養装置内(37℃, 5% 炭酸ガス + 95% 空気)で5時間前培養した。残りの精子浮遊液は、屠場で屠殺直後に生体から単離した未経産雌ブタ子宮内に注入し、子宮を37℃に加温した0.9% NaCl 液中に浸漬して5時間静置した。

m-KRB 液あるいはブタ子宮内で前培養後に回収したブタとヤギ精子を、まず0.2M リン酸緩衝液(pH 7.4)を添加した2.5% グルタルアルデヒド液中で1時間固定し、0.1M リン酸緩衝液を添加した1% 四酸化オスミウムで後固定した後、0.1M リン酸緩衝液中で充分洗浄した。その後、50-100% のアセトン漸強列で脱水後、エポン812 と 815 の混合液中に試料を包埋した。Potter-Blum I型ウルトラミクロトームで超薄切片を作成し、フエニ酸鉛と酢酸ウ

ラニルで電子染色を行った後、JEM 100C 型電子顕微鏡を用い、100kV の加速電圧下で観察を行った。

II. 実験結果

m-KRB 液中で5時間前培養後のブタ精子は全体の形態をよく保持していたが(図4, a), ブタ子宮内で5時間前培養後の精子には種々の形態的变化が観察された(図4, b~d, 図5および図6)。これらの変化は、大きく以下の4つに分類することができた。すなわち、1) 細胞膜(plasma membrane)が先体外膜(outer acrosomal membrane)から離脱している以外には、intact な精子(図4, a)と比較して著しい差の認められなかったもの(図4, b)。2) 精子の明瞭な形態変化が精子頭部の先体内に認められたもの(図4, c, d および図5, a, b)。この場合、先体内内容物内に大小の空胞(vacuole)が形成されたり(図4, c および d), 先体内内容物を大部分消失した精子では微小管様の小

胞の存在が観察された(図5, aおよびb)。

3) 先体反応, すなわち頭帽(acrosomal cap)において連続した小胞形成(vesiculation)の認められたもの(図5, cおよびd)。この場合, 後部領域, すなわち赤道帯(equatorial segment)の形態的变化は認められなかった。小胞形成には, 図6, aに示されるように, 細胞膜と先体外膜が関与していることが形態的な差異から明らかとなった。小胞形成が頭帽でのみ誘起されていることは, 水平な精子の断面からも推察されたが, 赤道帯に一致する部位には微小顆粒が観察された(図6, b)。4) 小胞が離散しているか, 赤道帯の細胞膜と先体外膜が大部分消失した退行的形態変化を示したものの(図5, e)。

これらの種々の形態的变化を示す精子の割合を調べた結果, 表10に示すように, 上記分類3)の正常と思われる先体反応を示す精子(42.5%)あるいは分類2)の先体内に大小の空胞の形成された精子(37%)の割合が最も高か

った。

ブタ子宮内で5時間前培養後に100個のヤギ精子を検査した結果、そのうちの20%に図7, aおよびbに示すような先端反応と思われる連続した小胞形成が観察されたが、これらの精子では、頭帽ばかりでなく赤道帯にも小胞形成が認められ、さらに核膜肥厚部 (postacrosomal region) の細胞膜は核膜から離脱していた。それ以外のほとんどの精子は先端全体が頭部から消失した退行的変化をおこした精子であった (図7, c)。

Ⅲ、 考 察

本実験結果から、未經産雌ブタ子宮内で5時間前培養したブタおよびヤギ精子には、m-KRB液中で5時間前培養後 (図4, a) や射出直後の精子 (Nicander and Bane, 1962) とは明らかに異なった形態的变化が精子頭部に誘起されることが明らかにされた。とくに、頭帽に認められた小胞形成 (図5, c および d, 図6, a

FIG. 4

Ejaculated boar spermatozoa preincubated for 5 hr in a m-KRB medium (a) or in the uterus isolated from a maturing gilt (b-d), sectioned after fixation and staining, and then photographed under an electron microscopy.

a). A sagittal section showing the acrosomal cap region (ACR), the equatorial segment (ES) and the postacrosomal region (PAR) which remain intact. X 22,000.

b). A sagittal section showing the swelling of the plasma membrane (PM) around the sperm head. X 26,000.

c) and d). A sagittal (c) or transversal (d) section showing small (c) or large (d) vacuoles in the acrosomal contents. The acrosomal cap of the sperm head is slightly swollen. X 25,800 (c) and X 16,100 (d).

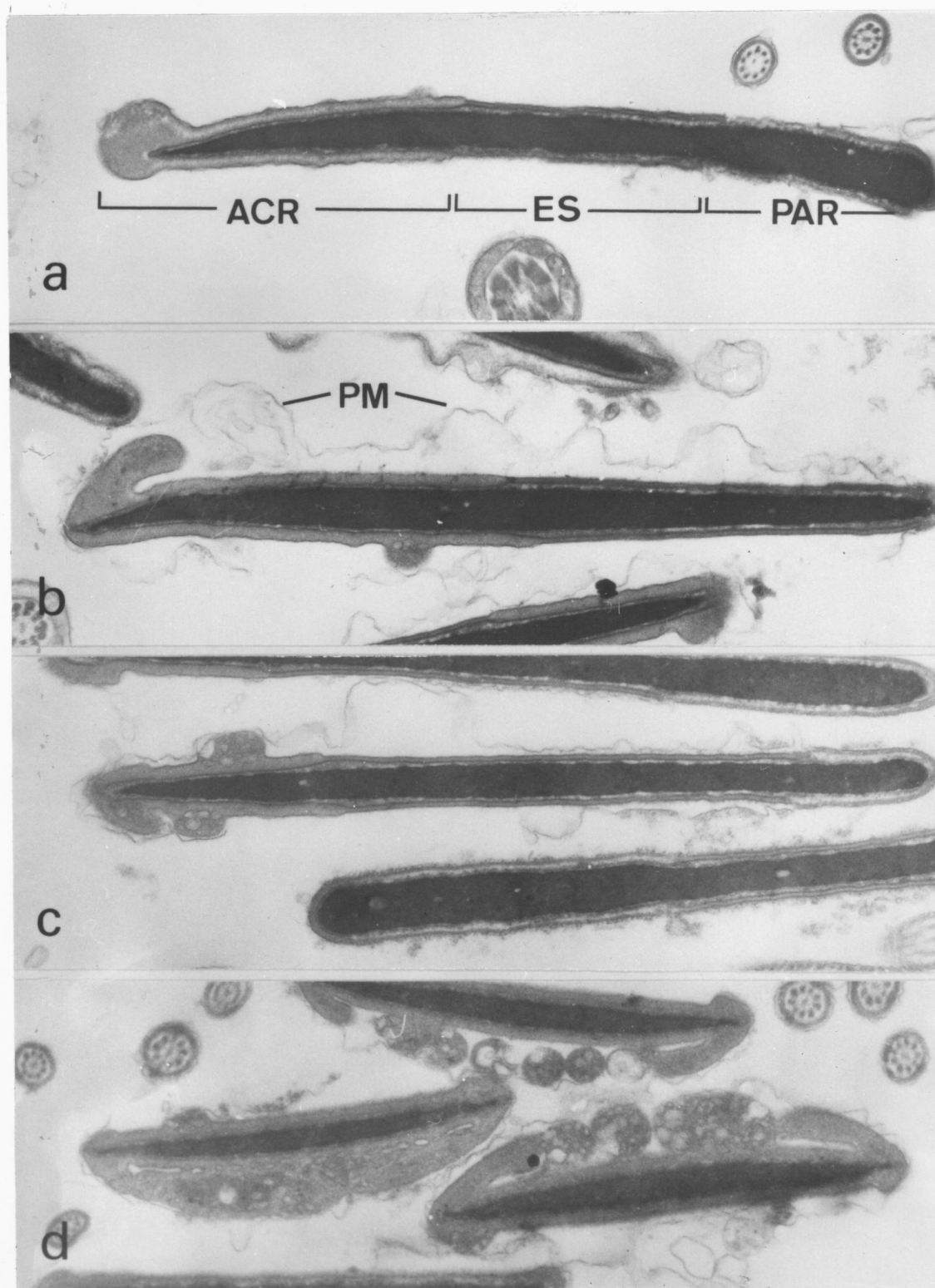


FIG. 5

Ejaculated boar spermatozoa preincubated for 5 hr in the uterus isolated from a maturing gilt, sectioned after fixation and staining, and then photographed under an electron microscopy.

- a) and b). A sagittal (a) or transversal (b) section showing the swelling of the acrosome. The acrosomal contents disperse and the microtubule like structures appear in the acrosomal cap region. X 25,500 (a) and X 27,500 (b).
- c). A transversal section showing the membrane vesiculations (V) of sperm head. X 34,800.
- d). A sagittal section showing the progressive membrane vesiculations (V) of the acrosomal cap region. The equatorial segment (ES) remains intact. X 29,100.
- e). A sagittal section showing discontinuity of membrane vesiculations of the acrosomal cap region. The equatorial segment (ES) is also vesiculated. X 30,000

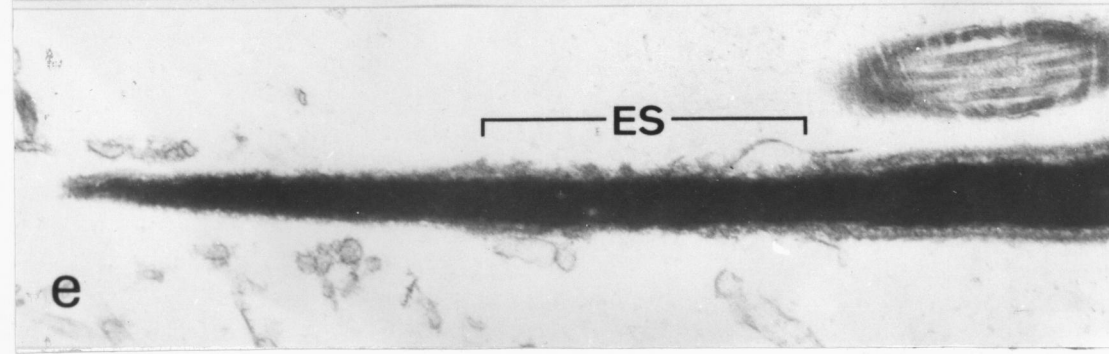
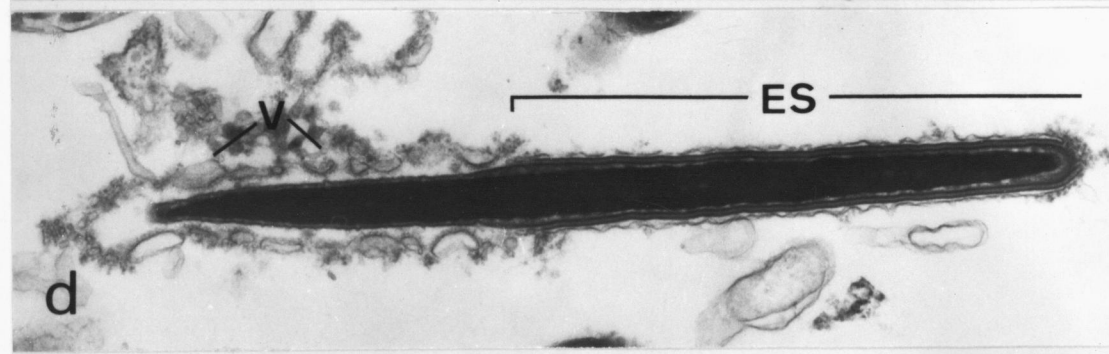
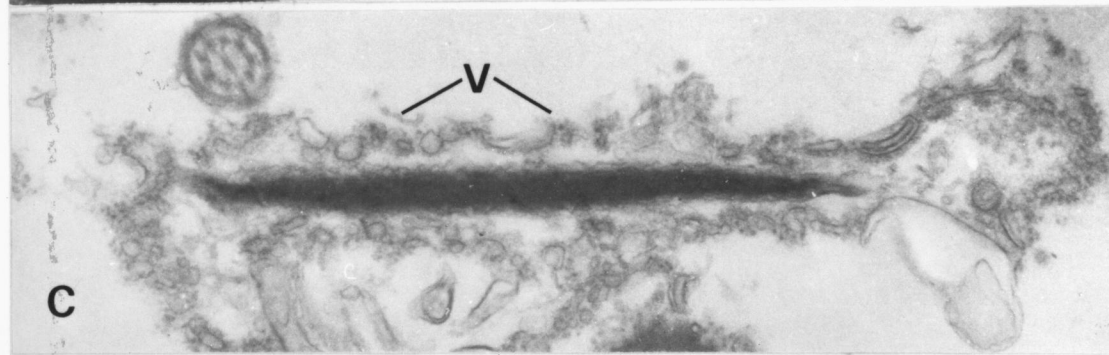
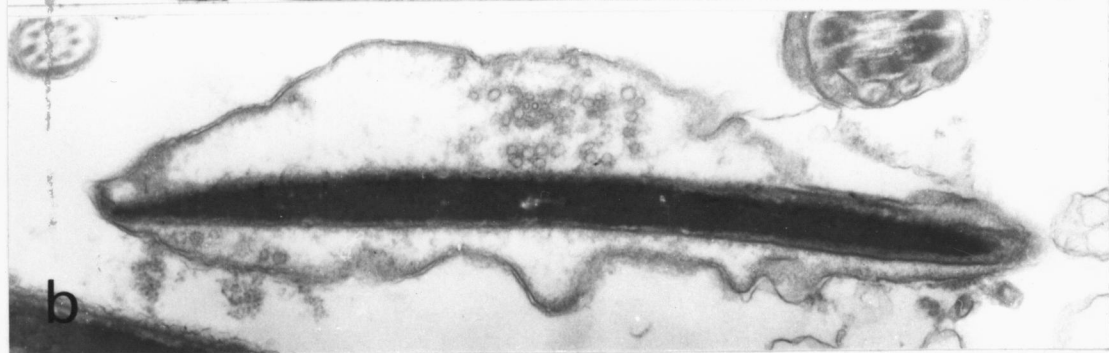
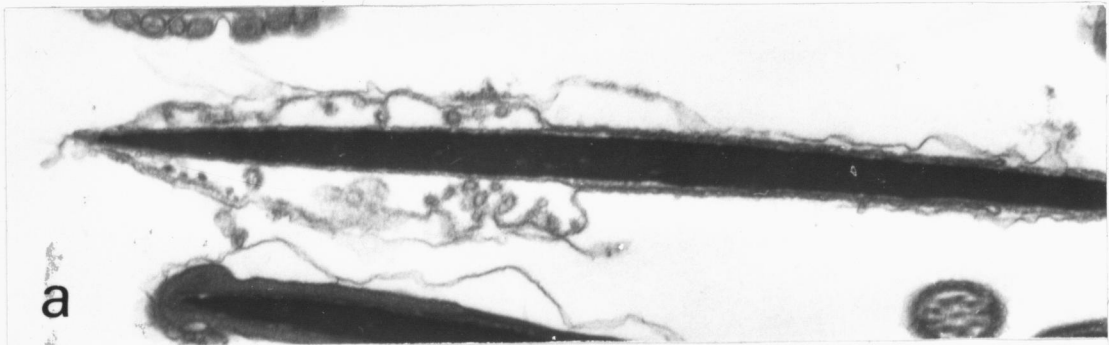
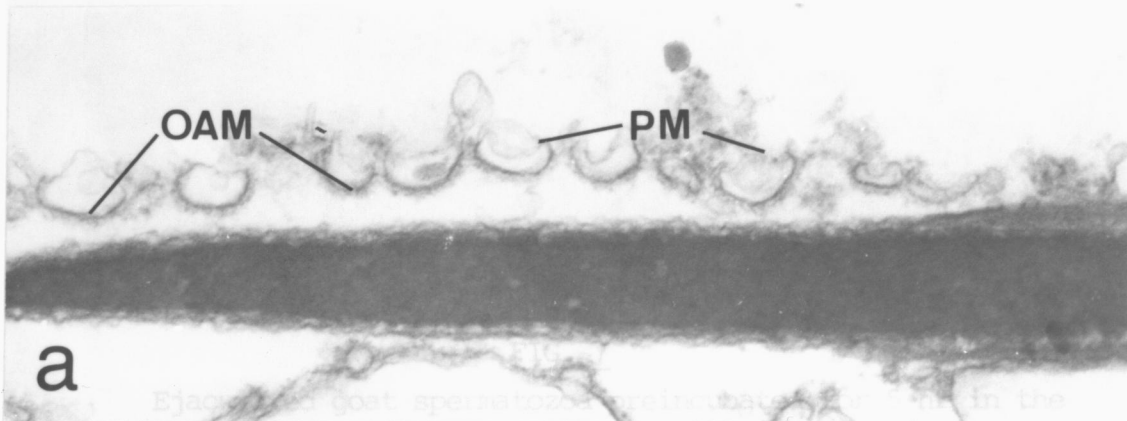


FIG. 6

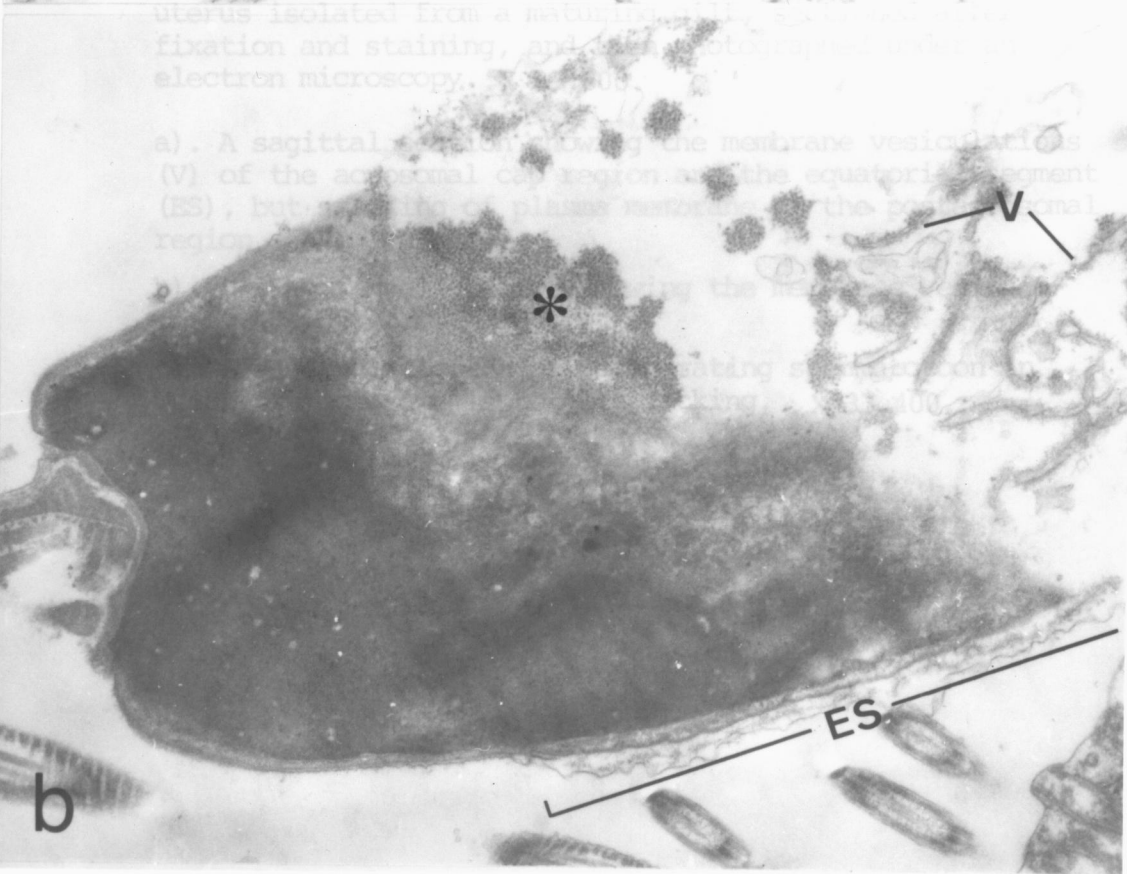
Ejaculated boar spermatozoa preincubated for 5 hr in the uterus isolated from a maturing gilt, sectioned after fixation and staining, and then photographed under an electron microscopy.

a). A sagittal section showing the membrane vesiculations of the acrosomal cap region. It is clear that the vesiculations occur by the fusion of two different membranes, the plasma membrane (PM) and the outer acrosomal membrane (OAM). X 57,100.

b). A longitudinal section showing the membrane vesiculations (V) of the acrosomal cap region and the hexagonal particles (asterisk) in the equatorial segment (ES). X 24,900.



a



b

FIG. 7

Ejaculated goat spermatozoa preincubated for 5 hr in the uterus isolated from a maturing gilt, sectioned after fixation and staining, and then photographed under an electron microscopy. X 29,600.

a). A sagittal section showing the membrane vesiculations (V) of the acrosomal cap region and the equatorial segment (ES), but swelling of plasma membrane of the postacrosomal region (PAR). X 35,000.

b). A transversal section showing the membrane vesiculations (V) of sperm head.

c). A sagittal section of degenerating spermatozoon in which the acrosome is totally lacking. X 33,400.

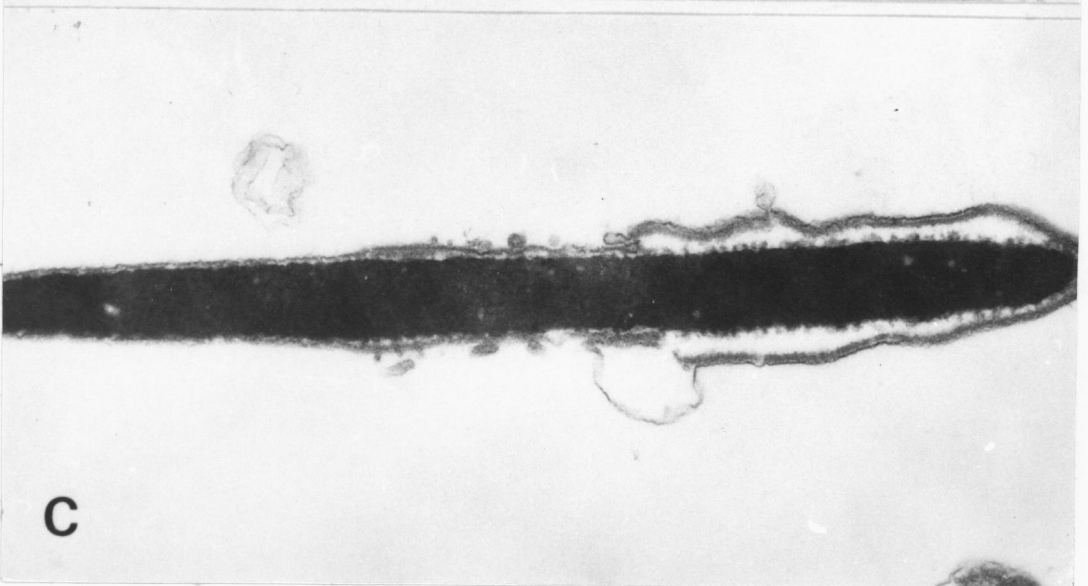
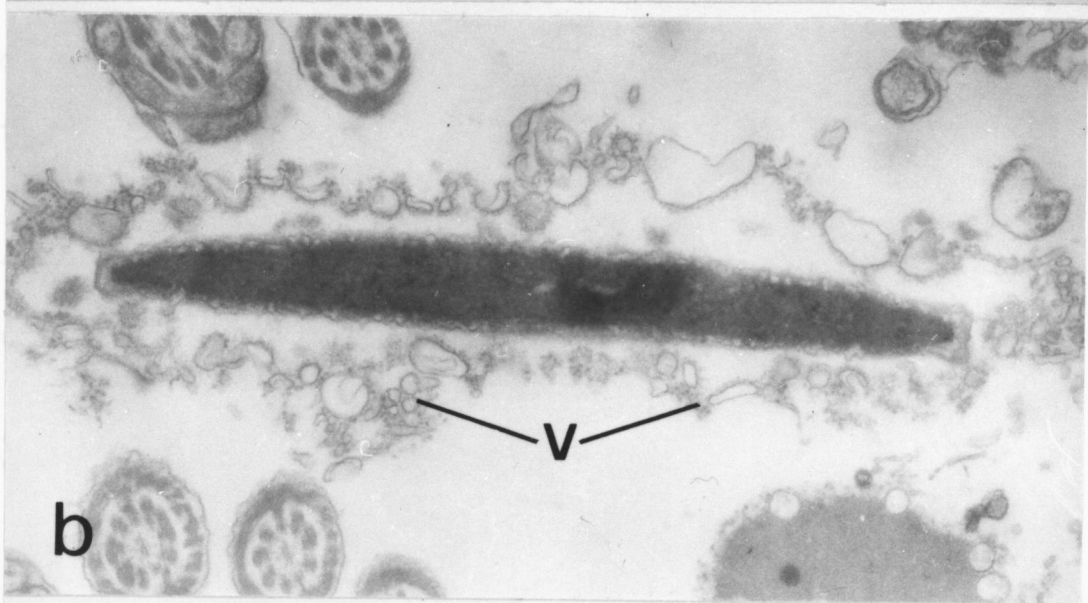
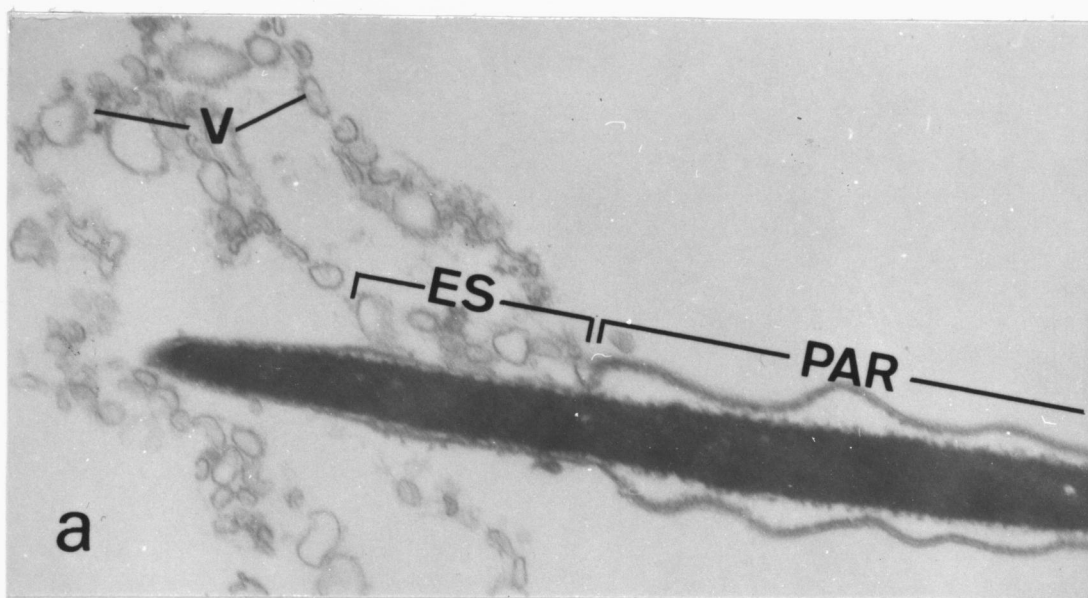


TABLE 10

MORPHOLOGY OF BOAR SPERMATOZOA PREINCUBATED FOR 5 HOURS IN THE
UTERUS ISOLATED FROM A MATURING GILT*

	Morphology of acrosome			
	1) Intact	2) Vacuolated	3) Reacted	4) Degenerated
No. of sperm counted	38	74	85	3
%	19	37	42.5	1.5

* Total number of spermatozoa examined was 200.

および b, 図 7, a および b) は, これまで報告された他の多くの哺乳動物の先体反応の形態的特徴 (Pikó and Tyler, 1964; Barroo et al., 1967; Bedford, 1968; Soupart and Strong, 1974; Yanagimachi and Usui, 1974; Mori and Uchida, 1981) とよく一致していた。図 6, a から明らかなように, 小胞形成には二種類の形態的に異なった膜, すなわち細胞膜と先体外膜との膜融合によって起こることが示唆された。この先体反応は, 融合膜の連続性の欠陥 (図 5, e) や頭帽全体の消失 (図 7, c) 等の精子の退行にともなって生ずる変化, すなわち "false acrosome reaction" (Bedford, 1970) と明確に区別できた。一方, 発情未經産ブタの子宮内で 1-1.5 時間前培養した精子では約 5% の精子に先体反応が認められるにすぎないことが知られているので (Esbenshade and Clegg, 1980), 本実験の 5 時間の前培養によって, 先体反応の誘起された精子がさらに増加したと考えられる。しかし, 現在のところ, 子宮内にあってブタ

ややぎ精子の先体反応に関与している要因については不明である。

ハムスター精子では、先体反応にさきだつて、明瞭な形態的变化をともなわずに先体内容物（ヒアルロニダーゼ）が精子頭部から放出されることが知られている（Talbot and Franklin, 1974）。同様のことは、ブタ精子では頭帽内の空胞化によつてもたらされるかもしれない。いくつかの哺乳動物においても、先体内に微小管（Peterson et al., 1978; Stambaugh and Smith, 1978）やアクチン（Clarke and Yanagimachi, 1978）の存在が認められており、先体内容物の放出や先体反応に関与している可能性がある。これまでのところこれらの生理学的役割については不明であるが、子宮から回収後の精子の生存性はおよそ60%であり、一方、このような空胞化のみられた精子の割合は37%であったので（表10）、頭帽内の空胞化は一種の退行的な変化である可能性も考えられる。

先体反応の誘起されたブタ精子の赤道帯部位の形態は intact に保持されていたが (図5, d および図6, b), ヤギ精子ではほとんど消失していた (図7, a)。ブタ精子では, この部位に先体内膜と先体外膜とを強固に結びつける膜内骨格が存在し, 界面活性剤 (triton X 100) やプロテアーゼ (trypsin) で短時間処理しても崩壊しないことが知られているので (Russell et al, 1980), 本実験でブタ精子と同様に処理したヤギ精子の赤道帯が消失していたのは, ヤギ精子にはこのような膜内骨格が存在しないか, 外的環境の変化によってより容易に膜変化が誘起されるためかもしれない。ハムスター (Yanagimachi and Noda, 1970b), ヒト (Soupart and Strong, 1974) およびブタ (Szöllösi and Hunter, 1973, 1978) の精子では, 赤道帯は透明帯通過時に消失することが観察され, intact な赤道帯から放出される酵素が透明帯の通過に関与していることが示唆されている。本実験と同様に処理して先体反応を誘

起したヤブ精子は, intactな卵胞卵に侵入しえないが, 透明帯を除去了した卵胞卵には高率に侵入しうることが報告されているので (Kim, 1981), 赤道帯を欠いた精子は透明帯を侵入しえないが, 卵子の細胞膜と膜融合する能力は有していると思われる。同様に, 透明帯除去卵子に侵入しうるが intactな卵子に侵入しえないようなハムスター精子では赤道帯の消失が観察されている (Banoo et al., 1973)。

家畜では, 体外の培養液中で誘起された先体反応を観察した例はこれまでにないが, 培養液に添加したカルシウムイオンの透過担体 (ionophore) である A23187 は, 先体反応と極めて類似した形態的变化を誘起しうることがウシ (Byrd, 1981), ブタ (Peterson et al., 1978) およびヒツジ (Jamil and White, 1981; Shams-Borhan and Harrison, 1981) の精子で報告されている。この変化は非常に短時間で誘起され, 精子は intactなブタ卵子 (豊田ら, 1981) やヒツジの透明帯除去卵胞卵 (Shams-Borhan and Harrison, 1981)

に侵入しうるので、卵子への精子侵入に必要な条件は capacitation の過程について起る先体反応であることが示唆される。

IV. 摘 要

m-KRB 液中あるいは未經産雌ブタの子宮内で5時間前培養後のブタ精子の形態を電子顕微鏡を用いて比較検討した。また、ブタ精子と同様の方法でブタ子宮内で前培養処理したヤギ精子の形態についても検討を試みた。得られた結果はつぎのとおりである。

1. m-KRB 液中で5時間前培養後のブタ精子の形態は、射出直後の精子のそれと類似しており、形態的变化は認められなかった。

2. 未經産ブタ子宮内で5時間前培養後のブタ (42.5%) およびヤギ精子 (20%) には、先体反応に特徴的な頭帽部位の小胞形成が認められた。また、この小胞形成には細胞膜と先体外膜との膜融合の関与していることが示唆された。

3. 先体反応の誘起された精子の赤道帯は、ブタ精子では intact に保持されていたが、ヤギ精子では消失しているのが観察された。赤道帯の消失は精子の透明帯通過を困難にする可能性が示唆された。

4. 以上のことから、前章において、雌性生殖器内で誘起され、透明帯除去ハムスター卵子を用いて検討してきた家畜精子の生理学的変化は *capacitation* の過程につづいて起った先体反応であると推察されるが、この点については、精子侵入をうけたハムスター卵子を用いてさらに検討する必要がある。

第3節 透明帯除去ハムスター卵子内に侵入前後のブタ精子の微細構造的観察

前節では、子宮内で5時間前培養後に回収したブタおよびヤギ精子の微細構造的観察から、培養中の精子の生理学的変化は *capacitation* 誘起後の先体反応である可能性を示唆した。生体内で受精したブタ卵子の電子顕微鏡による観察 (Szöllösi and Hunter, 1973, 1978) においても、精子が透明帯を通過するためには先体反応の必要なことが示唆されているが、その後の両配偶子間の膜融合については全く知られていない。そこで、本節では、卵子との膜融合にも先体反応が必要か否かを検討するため、ブタ卵子のかわりに透明帯除去ハムスター卵子を用い、卵子への侵入前後のブタ精子の形態を電子顕微鏡を用いて観察した。

I. 実験材料および方法

ランドレース種雄ブタから採取した射出精子を m-KRB 液で2回洗浄後、炭酸ガス培養装

置内 (37°C, 5% 炭酸ガス + 95% 空気) の 0.4 ml の m-KRB 液あるいは屠場で屠殺直後に生体から分離した未經産雌ブタの子宮内で5時間前培養した。授精は、前培養後のそれぞれの精子浮遊液中に、0.1% ヒアルロニダーゼと 0.1% トリプシンにより透明帯を除去したハムスター卵子を導入して行った (精子濃度 = $0.3-3.0 \times 10^6 / \text{ml}$)。炭酸ガス培養装置内で2時間培養後に、一部の卵子を中性ホルマリンで固定、アセトラクモイドで染色して、位相差顕微鏡下で精子侵入の有無を観察し、残りの卵子は電子顕微鏡用の試料として用いた。なお、精子の処理や授精の詳細な方法については、すでに第2章の第2節で述べたとおりである。

ハムスター卵子の電子顕微鏡用の試料は、第3章の第2節で述べたように、2.5% グルタルアルデヒドにつぶき1% 四酸化オスミウムでそれぞれ1時間固定し、アセトン漸強列で脱水後に、エポキシ樹脂 (エポン 812 と 815) 中に卵子を包埋した。包埋後の試料から超薄

切片を作成し、クエン酸鉛と酢酸ウラニルで二重染色した後、JEM 100C透過型電子顕微鏡を用いて卵子と精子の形態を観察した。

II. 実 験 結 果

m-KRB液中で5時間前培養したブタ精子を透明帯除去ハムスター卵子に授精し、2時間後に検査した結果、精子侵入は認められなかった(0/28)。卵子の周囲には多くの精子が付着していたが、微細構造的には、先体から細胞膜が離脱している以外に精子の形態的变化は観察されなかった(図8, a)。

未経産雌ブタ子宮内で5時間前培養後のブタ精子を透明帯除去ハムスター卵子に授精し、2時間後に検査した結果、48個の卵子にすべて精子侵入が認められ、しかも多精子侵入卵であった。卵子表面には intactな精子(図8, b)が観察されたが、卵子細胞質内では種々の異なった頭部の形態的变化(図8, c-e)が位相差顕微鏡により観察された。電子顕微鏡で見

た卵子の表面には、intactな形態を有する精子と先体反応の誘起された精子（図9, a）の両者が観察されたが、両配偶子間の膜融合は先体反応の誘起された精子にのみ認められた（図9, b）。先体反応誘起精子は卵子の微絨毛（microvilli）によって主に先体の部位で捕えられ（図9, a）、微絨毛がintactな赤道帯に集中して付着し、この部位の細胞膜と先体外膜を取り除くような像がいくつかの場合で観察された（図9, a）。図9, b から明らかなように、配偶子間の膜融合は先体後部領域をおおっている細胞膜で起っていた。一方、赤道帯の細胞膜はすでに先体外膜とともに消失していて膜融合には関与していなかった（図10, a）。

卵子との膜融合後、先体内膜は卵子細胞膜と接しながら赤道帯の後部域から頭部先端に向かって引きはがされ、細胞質内に取り込まれてゆくのが観察された（図9, b）。同時に、先体後部領域と赤道帯を両側からおおった細

胞質塊（図9, b）は、徐々に頭部先端に向かって進み精子全体を包み込むように卵子内に取り込んだ（図10, b, c および図11, a）。精子の染色質の拡散が進むにつれて核膜はいったん消失するが、その後膨化した精子頭部の周囲には小胞が認められるようになり（図11, b）、核膜の再形成はほとんど染色質の拡散の終わったもので観察された（図11, c）。この時期には、卵子の表層顆粒の大部分は放出されていた。その後、細胞質内に前核が形成されるが、ハムスター-卵子由来の前核、すなわち雌性前核（図12, a）とブタ精子由来の雄性前核（図12, b）とを形態的に区別することは困難であった。

上記のハムスター-卵子とブタ精子との間の膜融合から、卵細胞質内に取り込まれた精子頭部の変形の過程を模式図に示すと、図13のようになる。すなわち、卵子表面には intact (a) および先体反応の誘起された精子 (b) の両者が接着するが、後者のみが卵子との膜融

FIG. 8

a). Boar spermatozoa preincubated for 5 hr in a m-KRB medium and fixed 2 hr after insemination of zona-free hamster eggs. A spermatozoon is associated with the egg surface at the tip of the acrosomal cap, but no membrane fusion between sperm and egg. The acrosomal cap region (ACR) and the equatorial segment (ES) remain intact. X 21,900.

b-e). Phase-contrast micrographs of boar spermatozoa preincubated for 5 hr in the isolated uterus from a maturing gilt and stained 2 hr after insemination of zona-free hamster eggs. Spermatozoon (b) morphology on the egg surface is intact distinguishable with those (c-e) incorporated into the egg. Sperm chromatin begins to decondense from the front end of the postacrosomal region (arrow in c), and the decondensation progresses to the center or to the anterior and posterior ends of the sperm head (d). In (e) the early stage of transformation of the enlarged sperm head into the male pronucleus is shown. X 1,100 (b-e).

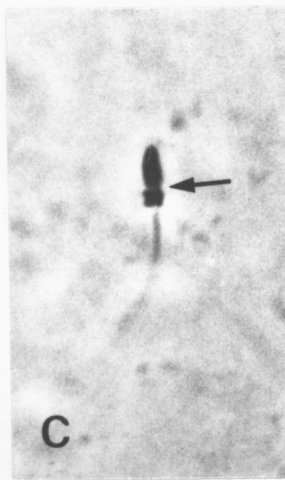
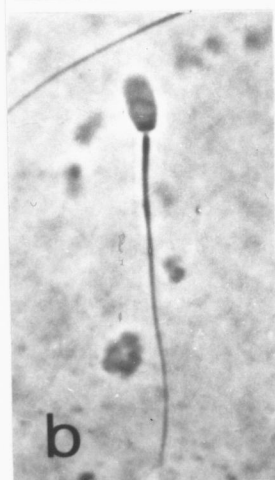
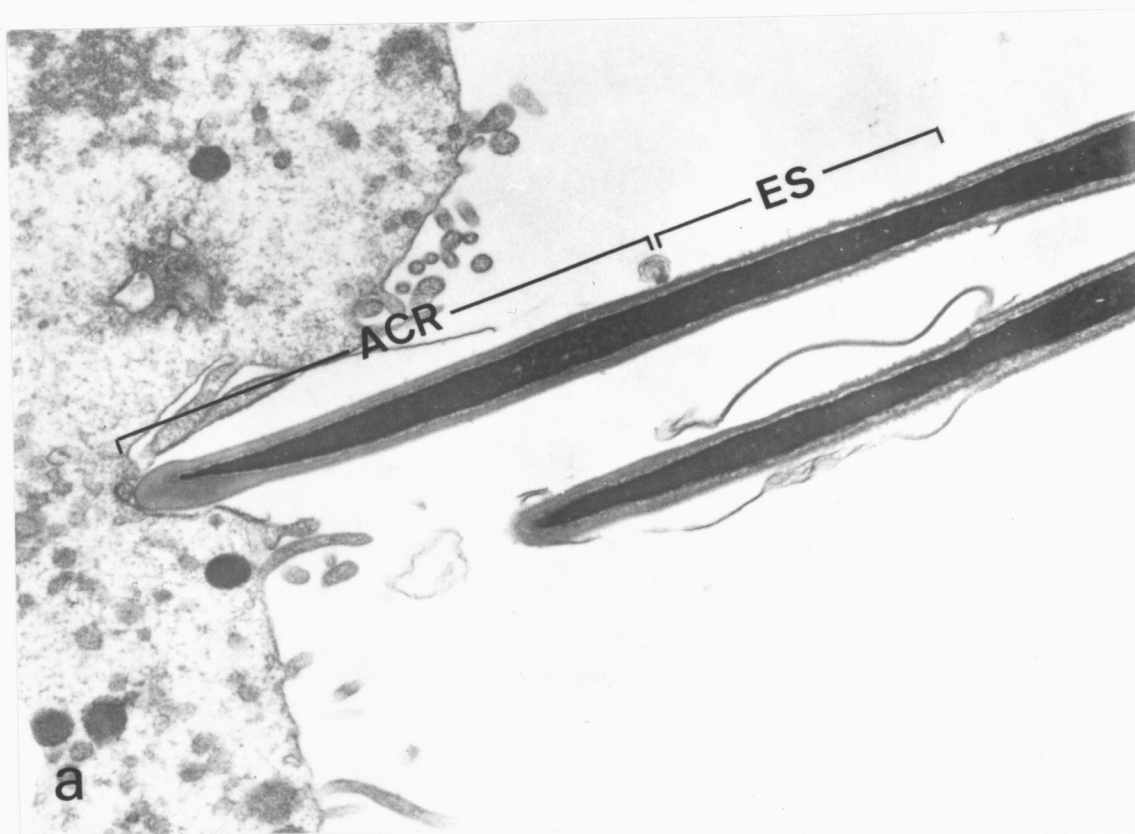


FIG. 9

Boar spermatozoa preincubated for 5 hr in the isolated gilt uterus and fixed 2 hr after insemination of zona-free hamster eggs.

a). A sagittal section of a spermatozoon on the vitelline surface. The plasma and the outer acrosomal membranes of the acrosomal cap region exhibit progressive membrane vesiculations (V). Microvilli of the egg become associated with the spermatozoon at the vesiculated membranes and the plasma membrane of the equatorial segment. X 17,300.

b). A sagittal section of a spermatozoon incorporated into the vitellus. The anterior portion of the sperm head is still outside the egg but the postacrosomal region has already fused with the egg plasma membrane. The detachment (arrow) of the inner acrosomal membrane (IA), apposed closely to the egg plasma membrane (EP), from sperm head progresses towards the region originally occupied by the equatorial segment. A portion of the nuclear membrane (NM) is still visible in the vitellus. X 34,200.

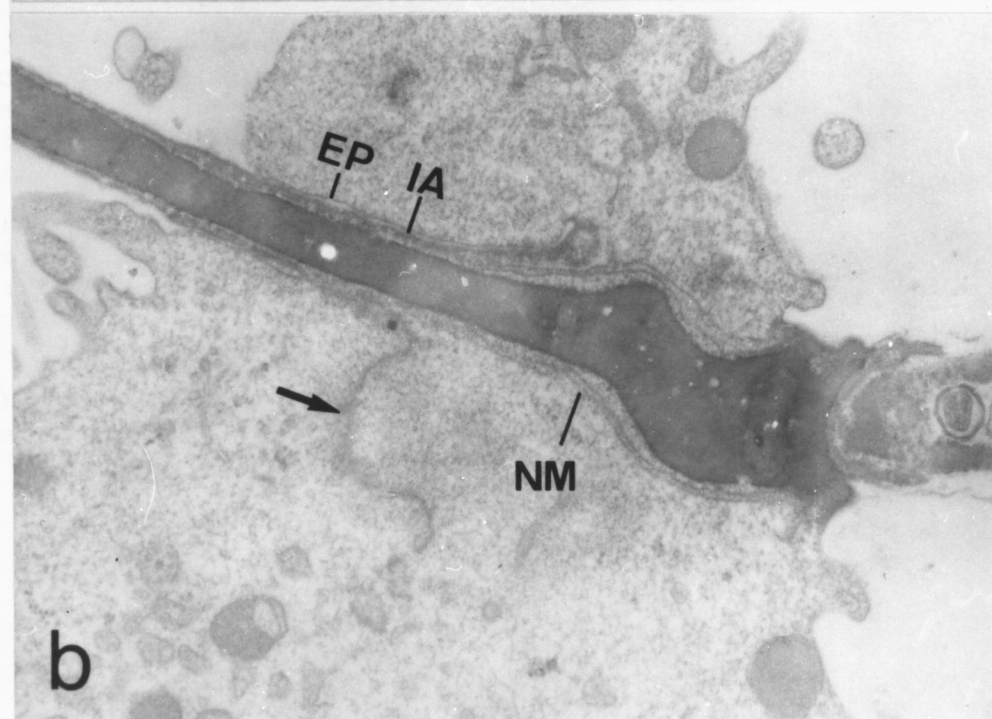
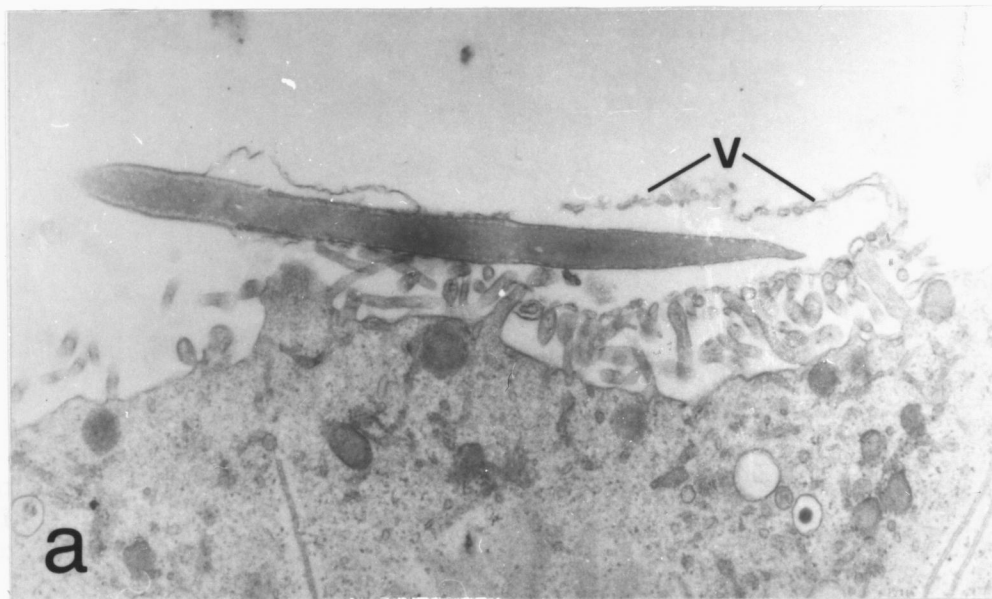


FIG. 10

Boar spermatozoa preincubated for 5 hr in the isolated gilt uterus and fixed 2 hr after insemination of zona-free hamster eggs.

- a). Membrane fusion (arrow) between sperm and egg plasma membranes begins at the anterior portion of the post-acrosomal region. At the portion of the equatorial segment (ES) the inner acrosomal membrane (IA) and the egg plasma membrane (EP) are closely associated and recognizable as the two unite membranes. X 44,900.
- b). The elongation of microvilli of the egg surface progresses towards the anterior portion of the acrosomal cap region (ACR). The inner acrosomal membrane (IA) of the equatorial segment (ES) associated with the egg plasma membrane (EP) is visible. X 38,600.
- c). A transversal section of the tip of acrosomal cap region which is covered by protrusion of the egg vitellus. X 27,300.

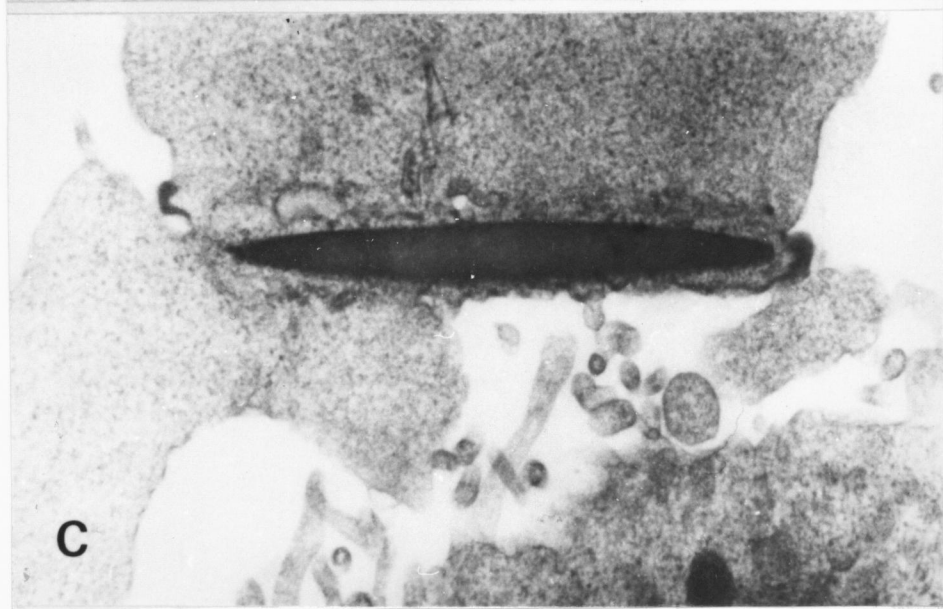
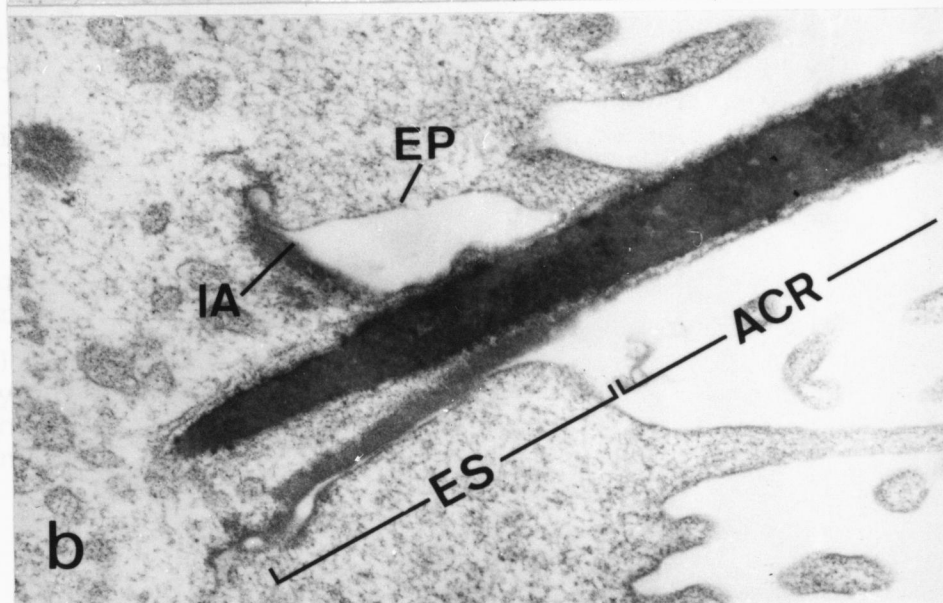
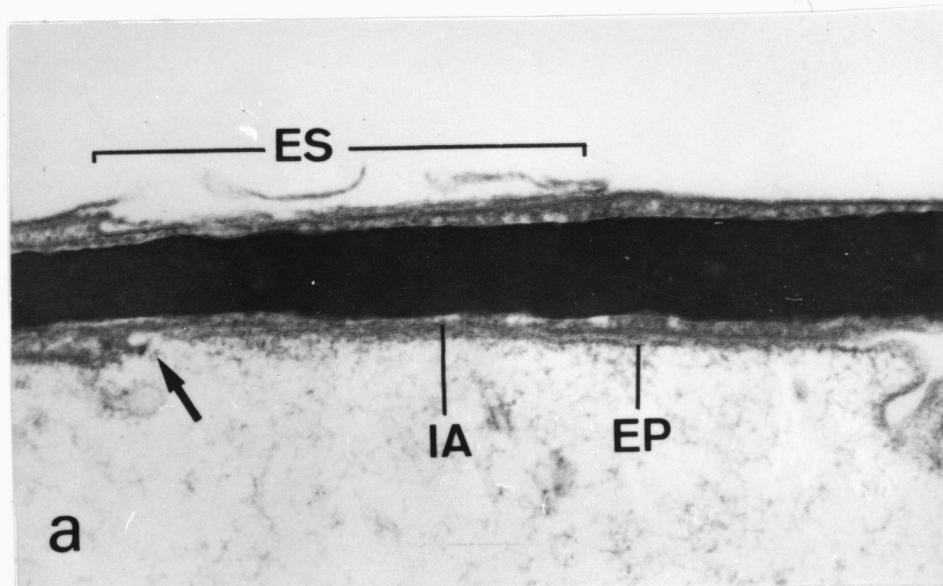


FIG. 11

- a). A transversal section at the posterior portion of the acrosomal cap of the same spermatozoon as shown in Fig.10, c. It is entirely covered by protrusion of the egg vitellus. Microvilli (MV) left behind the vitellus by its dynamic movement are visible. X 42,000.
- b). Early stage of decondensation of sperm chromatin. Cytoplasmic vesicles (CV) appear around the nuclear material. The inner acrosomal membrane (arrow) detached from the spermatozoon is visible. X 17,000.
- c). Sperm nucleus which is almost fully decondensed. The cytoplasmic vesicles unite to form a continuous nuclear envelope (NE). An arrow shows the mitochondrial sheath and axial filament complex of the spermatozoon. X 14,700.

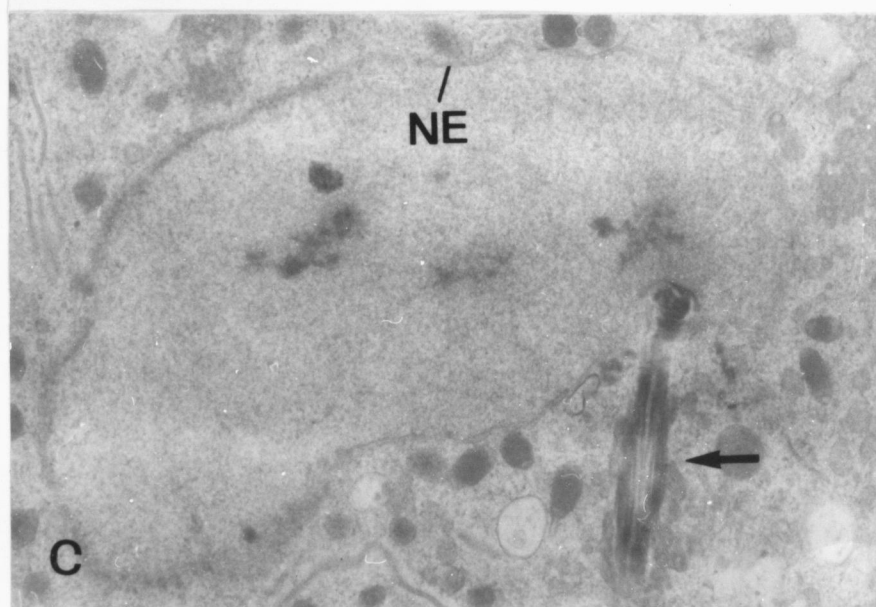
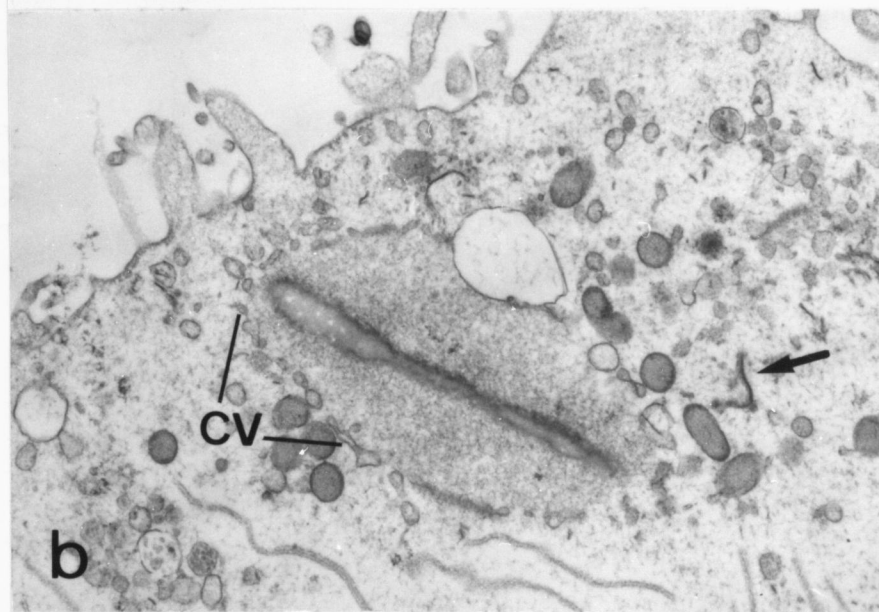
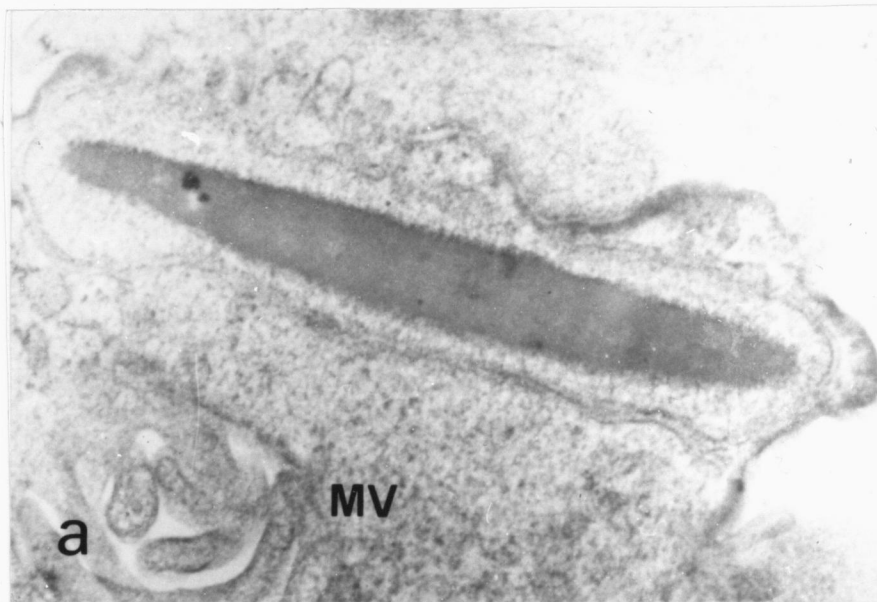


FIG. 12

Female (a) and male (b) pronuclei formed in a hamster egg after incorporation of boar spermatozoon preincubated for 5 hr in the isolated gilt uterus. No morphological difference between both pronuclei is noted. Several nucleoli are visible in the pronuclei. X 10,900 (a) and X 12,200 (b).

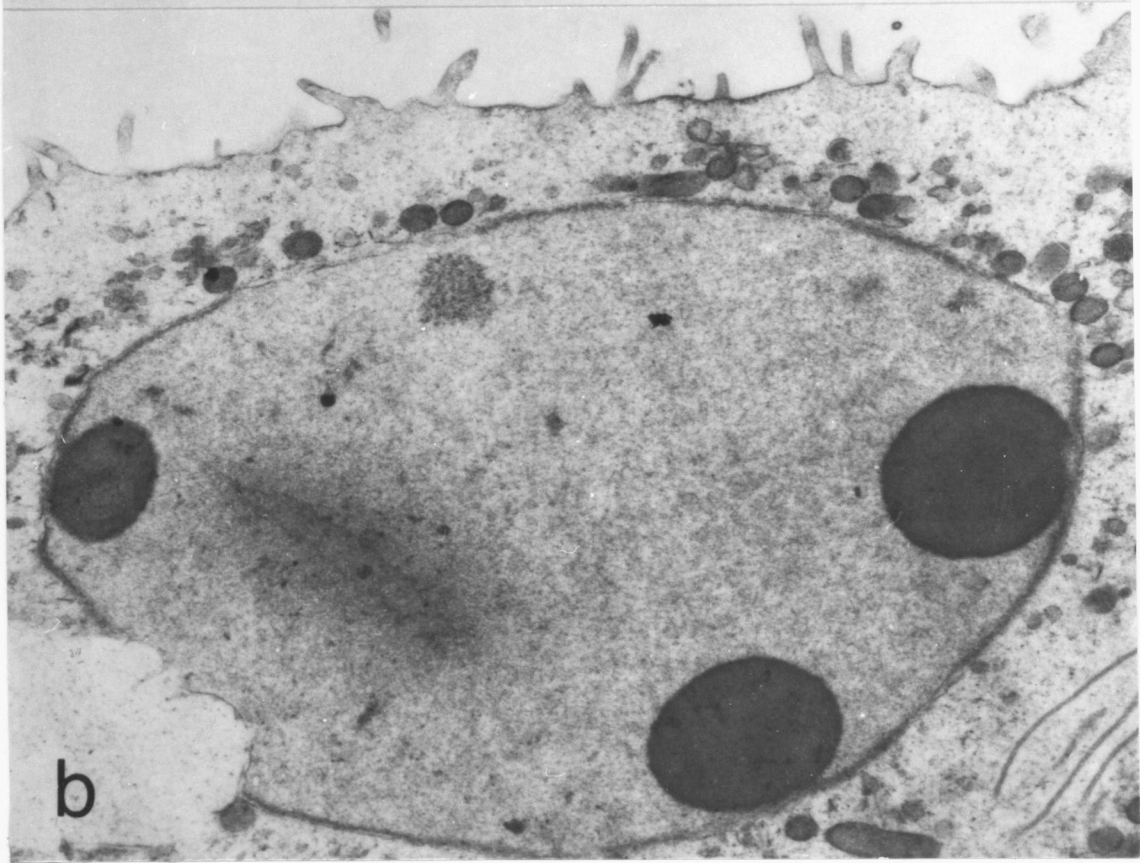
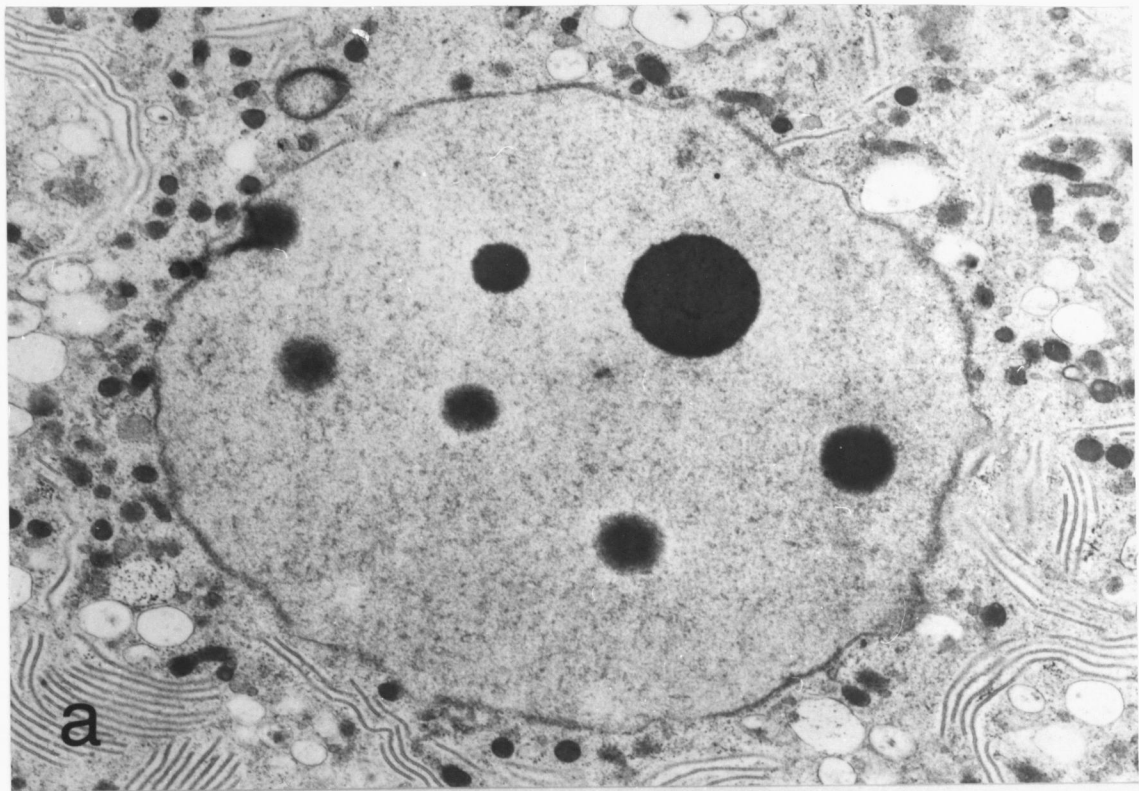
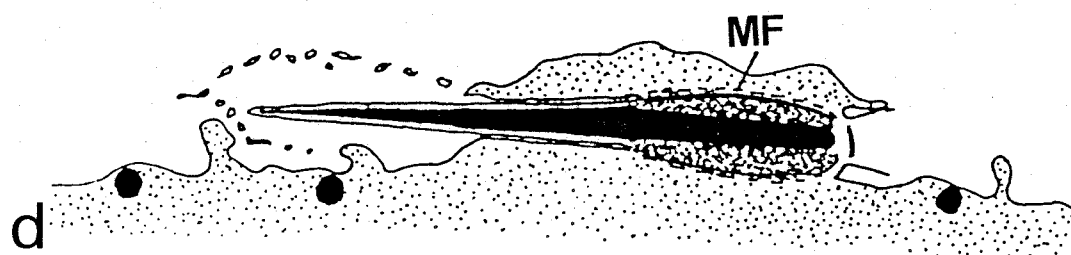
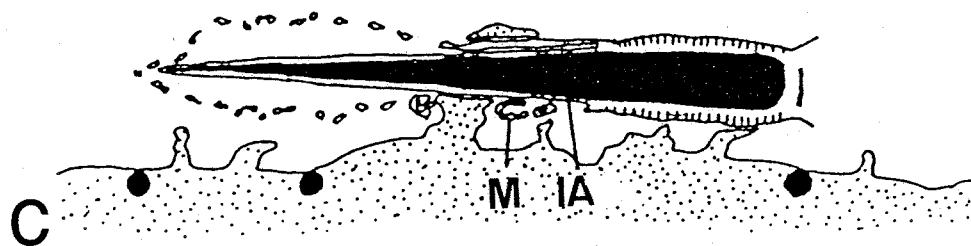
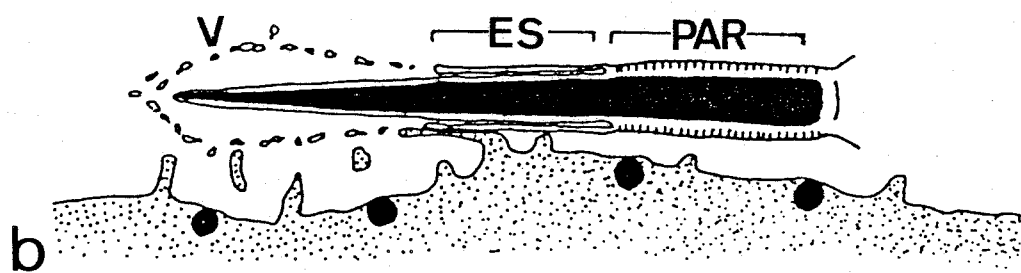
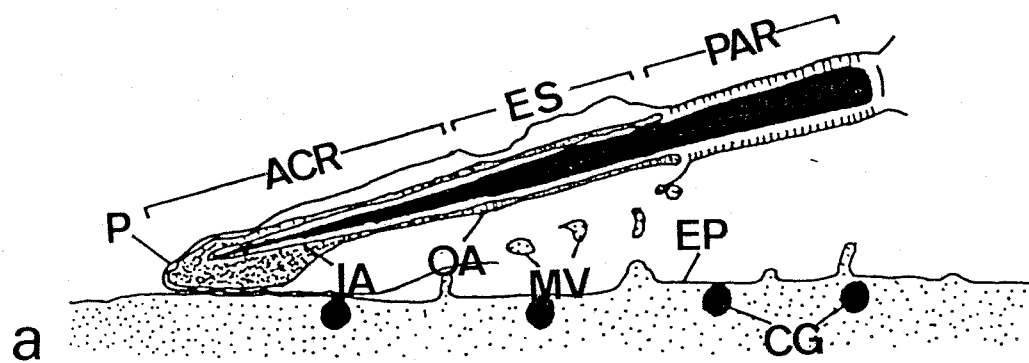
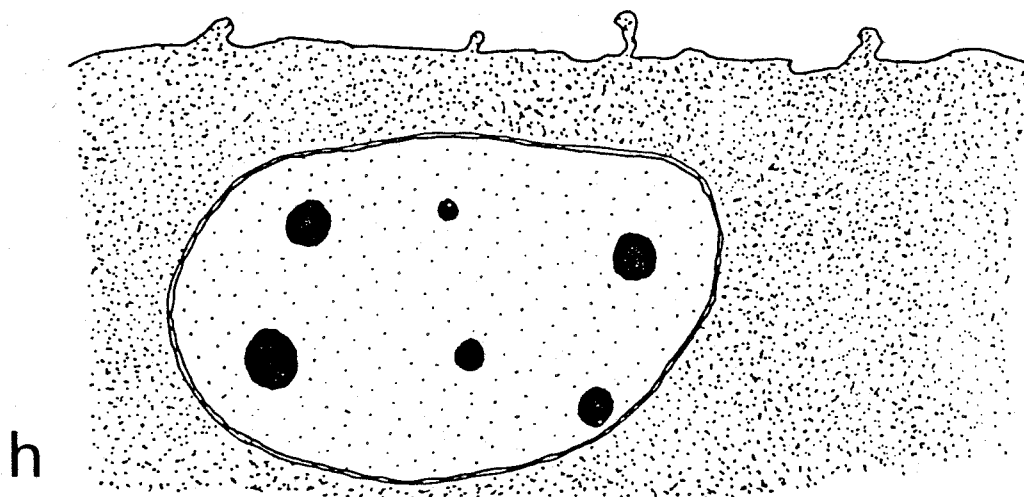
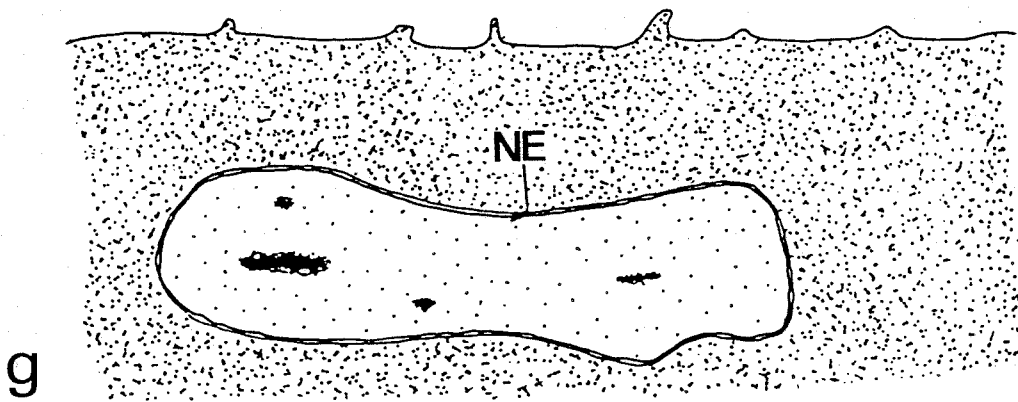
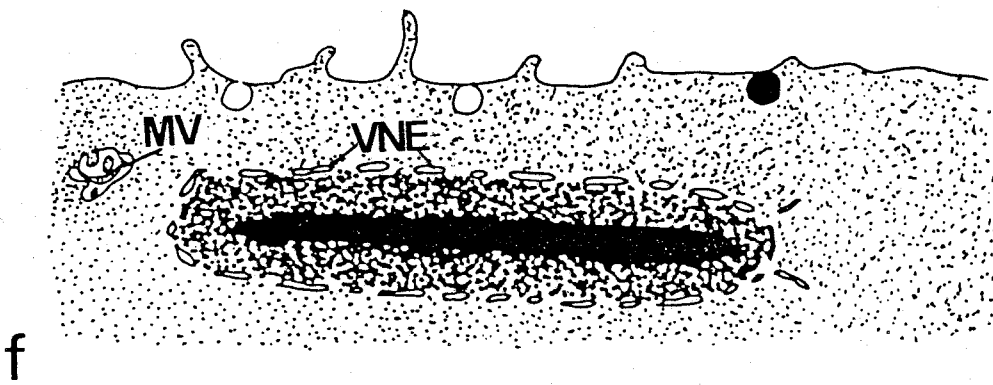
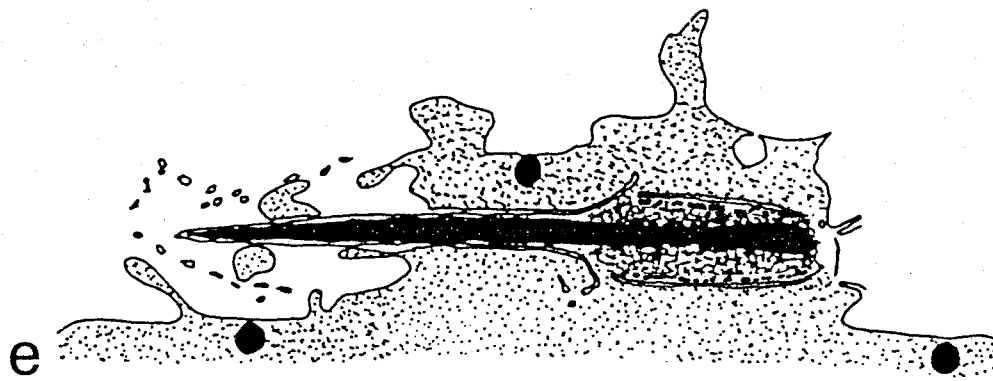


FIG. 13

Diagram of the sequence of events in penetration of boar spermatozoa into zona-free hamster eggs. Intact (a) and acrosome reacted (b) spermatozoa are trapped by microvilli of the egg surface. In the acrosome reacted spermatozoon, the sperm plasma and outer acrosomal membranes of the equatorial segment are removed by the microvilli (c). The plasma membrane of postacrosomal region fuses with the egg plasma membrane (d). Protrusion of the egg vitellus covers the surface of the sperm head and the inner acrosomal membrane associated with the egg plasma membrane is detached from the region of the equatorial segment (e). Some of the cortical granules begin to break down, and sperm nuclear membrane is newly formed as progressive vesicles (f). These vesicles unite to form a continuous nuclear envelope in the vitellus (g). Several nucleoli are formed in fully grown sperm pronucleus (h).

ACR, acrosomal cap region; CG, cortical granule; EP, egg plasma membrane; ES, equatorial segment; IAM, inner acrosomal membrane; M, membranous remnant removed by microvilli; MF, membrane fusion; MV, microvilli; NE, sperm nuclear envelope; OA, outer acrosomal membrane; PAR, postacrosomal region; SP, sperm plasma membrane; VNE, vesicles associating the formation of nuclear envelope.





合を起す。この場合、卵子微絨毛が赤道帯の細胞膜と先体外膜を機械的に除去し(c)、同時に先体後部領域と卵子の細胞膜間で融合が起こり(c-d)、卵細胞質塊が徐々に頭部先端に向って進み精子全体を取り込むようになる(f)。染色質の拡散が完全に終った時点で、核膜が再形成され、同時に卵子の表層顆粒も大部分放出される(g)。形成された前核内には明瞭な核小体が出現してくる(h)。

Ⅲ、 考 察

才2章の才2節の実験で得られた結果と同様に、透明帯除去ハムスター卵子に未經産雌ブタ子宮内で5時間前培養後のブタ精子を授精すると、2時間後にはすべての卵子に侵入が認められた。侵入卵子はすべて多精子侵入であり、しかも卵子内には種々の形態を有した精子頭部が観察されたので(図8, b-e)、精子と卵子の膜融合から前核形成までの種々の過程の超薄切片を得ることができた。

先体反応誘起精子は、子宮精子により授精した卵子の周辺にのみ認められたので、本章の才2節で述べたように、これらの精子は子宮内での培養中に先体反応が誘起されたものと考えられる。卵子表面には、*intact*な形態をもつ精子(図8, a)も先体反応の誘起された精子(図9, a)も同程度に観察されたが、いずれの場合にも先体の細胞膜と卵子の微絨毛との間で接触が起っていた。

卵子細胞質との膜融合は先体反応の誘起された精子との間でのみ起った(図9, b)。その開始部位は、ラット(Szöllösi and Ris, 1961), ハムスター(Barros and Franklin, 1968; Yanagimachi and Noda, 1970c), モルモット(Noda and Yanagimachi, 1976)やマウス(Stefanini et al., 1969; Thompson et al., 1974)の同種間受精や透明帯除去ハムスター卵子とモルモット(Barros and Herrera, 1977)およびヒト(Barros et al., 1979)精子の異種間受精において報告されているように、赤道帯の後部に位置する先

体後部領域の細胞膜で始まった(図10, a)。
一方, 赤道帯 (Bedford, 1972; Bedford et al., 1979)
あるいは赤道帯および先体後部領域 (Talbot
and Chacon, 1982) の細胞膜が最初の膜融合に
関与するという報告があるが, 少なくとも本
実験では, その後卵子表面の微絨毛によって
細胞膜と先体外膜が取り除かれるので(図9,
a), この部位の細胞膜は膜融合には関与し
ないと思われる。ブタ配偶子間の膜融合の詳
細な研究はないが, ブタ精子と透明帯除去ハ
ムスター卵子との膜融合は本質的には他の哺
乳動物のそれと同じであり, ブタ精子の先体
反応が誘起されたか否かの検定にハムスター
卵子が利用できることを示唆している。

先体後部領域の細胞膜は, intactな形態をも
つ精子も先体反応の誘起された精子のいずれ
も卵子細胞膜と接し得るが, 膜融合が起こ
るのは先体反応誘起精子のみであった。したが
って, 両者の膜の性質が異なっていることが
示唆されるが, おそらく capacitation 時 (Yanagi-

machi and Noda, 1970a) や先体反応誘起時の先体内酵素の放出 (Barrow, 1974) によって先体後部領域に何らかの変化が誘起されるものと考えられる。

膜融合後、尾部を含めた精子全体が細胞質塊に包まれるように卵子内に取り込まれた。細胞質内に取り込まれた微絨毛からも判断できるように (図11, a), 卵子の細胞質は非常に流動的な性質を有しており、精子を積極的に取り込むことが想像される。膜融合に関与した精子の細胞膜は細胞質内で急速に消失してゆくが (Yanagimachi et al., 1973), 先体内膜はかなり後まで卵子内に残存していた (図11, b)。雄性前核は、フタ卵子内に侵入したフタ精子のそれとはかなり異なる形態を示していた。すなわち, Szöllösi and Hunter (1973) が報告したような前核内の環状薄層板 (intra-nuclear annulate lamellae) は認められなかった。このことは、ハムスター-卵子がフタ精子の前核形成に関与している可能性が示唆されるが、

現在のところどのような機構で関与しているかは明らかにされていない。

IV. 摘 要

透明帯除去ハムスター卵子に m-KRB 液あるいは末経産雌ブタ子宮内で 5 時間前培養後のブタ精子を授精し、両配偶子の接着と精子侵入後の精子頭部の形態を電子顕微鏡を用いて観察した。得られた結果はつぎのとおりである。

1、透明帯除去ハムスター卵子への侵入は子宮回収精子によって授精した場合にのみ認められた。intact な形態をもつ m-KRB 液あるいは子宮内前培養後の精子は、いずれも卵子の細胞質表面に付着していたが、膜融合は先体反応の誘起された子宮精子とのみ起こった。

2、卵子との膜融合は先体後部域の細胞膜で始まった。膜融合に関与しない精子の先体内膜は、赤道帯部位から頭部先端に向かって引きはがされ、卵子内に取り込まれた。

3. 精子染色質の拡散と核膜の消失について雄性前核が形成されたが、これはハムスター-卵子由来の前核に類似しており、ブタ卵子内の雄性前核とは形態を異にすることから、ハムスター-卵子がブタ精子の前核形成に関与している可能性が示唆された。

4. 以上のことから、透明帯除去ハムスター-卵子へのブタ精子の侵入前後の形態的变化は、本質的には哺乳動物の同種間受精のそれとほぼ一致しており、ブタ精子の受精能力の検定に透明帯除去ハムスター-卵子を利用することが判明した。

第4節

小

括

第2章において、家畜精子に誘起された何らかの生理学的変化は透明帯除去ハムスター卵子を用いて間接的に検定が可能であることを示唆した。本章では、この生理学的変化を直接微細構造的にとらえることを目的として、まず未經産雌ブタ子宮内で前培養後に回収したブタおよびヤギ精子の形態について検討し、ついで、同様に処理したブタ精子を透明帯除去ハムスター卵子に授精後の両配偶子の膜融合と侵入後の精子の形態的变化を電子顕微鏡を用いて検討した。得られた結果はつぎのとおりである。

1. m-KRB液中で5時間前培養後のブタ精子には形態的变化は認められなかった。一方、未經産雌ブタ子宮内で5時間前培養したブタ精子の頭帽には、先体反応に特徴的な小胞形成が42.5%の精子で観察された。同様に処理したヤギ精子(20%)にも先体反応が認められ

たので、未經産雌ブタ子宮はブタやヤギ精子の先体反応を誘起する能力を有することが明らかとなった。

2、透明帯除去ハムスター卵子をm-KRB液あるいは未經産雌ブタ子宮内で5時間前培養したブタ精子により授精後、2時間目に卵子を固定して検査した結果、intactな形態を有した精子も先体反応の誘起された精子のいずれも卵子表面に接着しうるが、膜融合は先体反応の誘起された子宮回収精子にのみ観察された。

3、透明帯除去ハムスター卵子とブタ精子との膜融合や侵入後の形態的变化は哺乳動物の同種間受精の場合と本質的には同様であり、ブタ卵子の代用として透明帯除去ハムスター卵子を用い、その精子侵入の有無によってブタ精子の受精能力を検定しうることが判明した。

第 4 章

ハムスター-卵子の体外受精に関する研究

第 1 節 緒 言

精子の *capacitation* の誘起と卵子への侵入を哺乳動物の本来の受精部位から離れて、完全に体外の培養液中で実現することができれば受精のメカニズムを解明するうえで非常に役立つ。このような受精現象を体外で人為的に制御しうるような実験系は、Yanagimachi and Chang (1963, 1964) によりハムスターを用いてはじめて報告され、その後、本質的には同様の方法を用いて、ラット (Toyoda and Chang, 1974; Niwa and Chang, 1974), マウス (Iwamatsu and Chang, 1969; Toyoda et al., 1971), モルモット (Yanagimachi, 1972b), ヒト (Edwards et al., 1969), ウサギ (Brackett and Oliphant, 1975; Hosoi et al., 1981) およびイヌ (Mahi and Yanagimachi, 1976) で再現性の高い体外受精実験が可能となった。しかし、これらの動物種

のうちでハムスターは、次にのべるような理由によって受精研究にとってとくに中心的役割を果たしてきた。すなわち、(1)飼育、管理が容易である。(2)過排卵誘起処理に鋭敏に反応し、1個体から常時30-50個の新鮮な排卵卵を得ることが出来る。(3)精巢上体精子を容易に採取することが出来る。(4)先体反応にさきだち精子の運動様式が変化する(hyperactivation; Yanagimachi, 1981)。(5)精子の頭帽が大きいために、先体反応が誘起されたか否かを位相差顕微鏡下で容易に判定できる。

しかし、このような利点があるにもかかわらず、従来行われてきたハムスター卵子の体外受精法では高率に多精子侵入卵が生じるので、必ずしも完全な方法とはいえない。培養液を構成する成分は受精成績を左右する最も大きな要因となると考えられるが、ハムスターにおいてこの点を検討した報告は少ない。そこで、本章では、より簡単な系でのハムスター卵子の体外受精の可能性を検討するとと

もに培養液の構成成分，とくにウシ血清アルブミン（BSA）やエネルギー源（グルコース，ビルビン酸，乳酸）の影響について検討した。

第2節 排卵産物を伴ったハムスター卵子の完全合成培地内での体外受精

ハムスターでは、卵胞液 (Gwatkin and Andersen, 1969; Yanagimachi, 1969 a, b) あるいは血清 (Barros and Garavagno, 1970; Yanagimachi, 1970) のような生体液を含む Tyrode 液や組成の複雑な TC199 液を用いることによって高い受精率が得られている。一方、これらの生体液以外にも、排卵後の卵管内容物は体外でのハムスター精子の *capacitation* 誘起や卵子の受精に重要な役割を果たしていることが明らかにされているが (Gwatkin et al., 1972), この排卵産物の効果は用いる培養液によっては必ずしも現れるとは限らない。一般に体外受精の実験では、各動物種においてそれぞれ異なる組成からなる培養液が用いられているが、その必要性については不明である。各動物種に共通して用いられる培養液があれば、受精にかかわる要因について動物種間の比較が容易となる。そこで、本節では、ラット卵子の体外受精に用いられて

いる修正KRB液を用いてハムスター-卵子の体外受精の可能性を検討するとともに、排卵産物やBSA濃度が受精におよぼす影響について調べた。

I. 実験材料および方法

本実験で体外受精に用いた培養液は第二章の表1に示した組成から成るm-KRB液である。

ハムスターの精巢上体精子は成熟雄ハムスター（体重95-150g）の精巢上体尾部から得た。すなわち、精巢上体管の一部を切開し、噴出してくる精子塊を細いガラス棒の先で採取後、培養皿（35×11mm；豊島製作所）の中央部でパラフィンオイルで覆われた0.5mlの培養液中に導入した。精子が培養液中に充分拡散した後、ガラス棒を取り除いて原精子浮遊液とした。その後、図14に示すように、他の培養皿（60×15mm；Nunc）内の4箇所に滴下した0, 10, 40 および 90 μ l の培養液に対して、10 μ l の原精子液をそれぞれマイクロピ

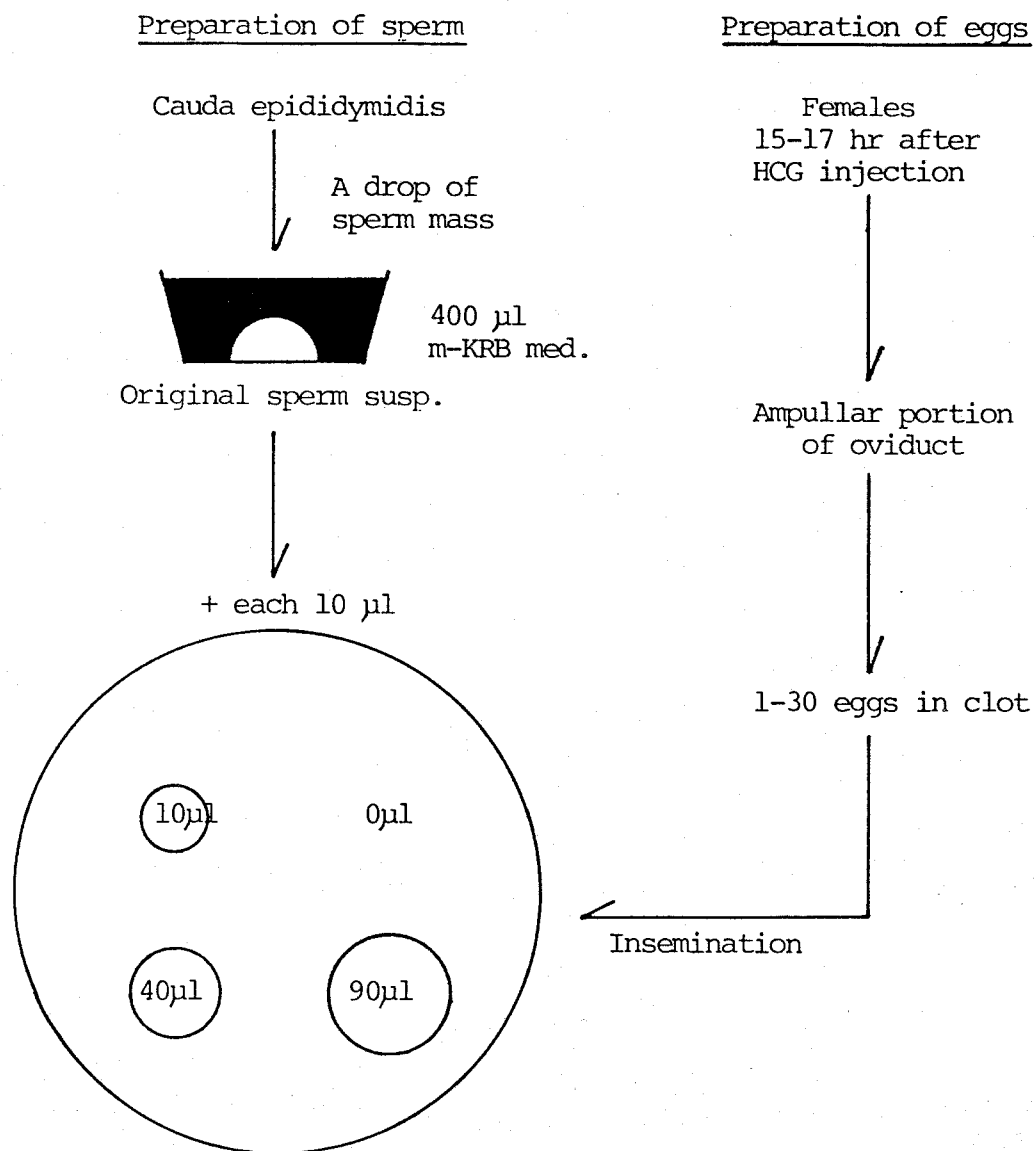


FIG. 14 EXPERIMENTAL PROCEDURES

ピットを用いて導入して容量の異なる4つの授精用精子浮遊液を作成した。したがって、含まれる精子の数は何れの授精用精子液においても同じであるが、精子濃度はそれぞれ $3-20 \times 10^6$, $1.5-10 \times 10^6$, $0.6-4.0 \times 10^6$ および $0.3-2.0 \times 10^6$ 精子/ml となった。

排卵卵子は、すでに第2章の第2節で述べたように、成熟雌ハムスター (104-211gr) に対する PMSG と HCG による過排卵誘起処理によって得た。HCG 投与の14-15時間後に動物を屠殺して摘出した卵管を培養皿内のパラフィンオイルに移した後、卵管膨大部から顆粒膜細胞に包まれた卵塊を柄付針の針先で引き出した。顆粒膜細胞を有した1-5, 6-10, 11-20 あるいは21-30個の卵子を容量の異なる4つの授精用精子液のそれぞれに導入して授精を行った (図14)。また、卵子以外の排卵産物を全く含まない条件下での受精の可能性を調べるために、0.1% のヒアルロニダーゼを含む培養液中で処理して顆粒膜細胞を取り除き、培

養液で2度洗淨後の裸化卵子の授精も試みた。

授精後、炭酸ガス培養装置(37°C, 5%炭酸ガス+95%空気)内に培養皿を静置し、8-8.5時間培養した後、2.5%グルタールアルデヒドで数分前固定し、才2章の才2節の方法に準じて中性ホルマリンによる固定とアセトラクモイド染色の後、位相差顕微鏡下で精子侵入の有無を観察した。

BSA濃度が受精におよぼす影響を検討するために、上記と同じ方法で0.4あるいは8mg/mlの濃度でBSAを含む40 μ lの授精用精子液を作成した(精子濃度=1.6-5.8 $\times 10^6$ /ml)。この中に約20個の卵子を含む卵塊を導入して授精を行った。授精後9-9.5時間で、卵子を上記と同様の方法で固定・染色して精子侵入の有無をチェックした。

囲卵腔あるいは卵細胞質内に侵入精子の存在が認められるものを精子侵入卵、卵細胞質内に精子尾部をともなった頭部膨化精子あるいは雄性前核を有するものを受精途上卵とし

た。さらに、卵細胞質内に1個以上の精子を認めた受精途上卵を多精子侵入卵とした。

II. 実 験 結 果

卵子を導入しなかった場合あるいは裸化卵子との共存下で培養された場合には、培養開始後2-3時間以内に大部分の精子において運動性は失われていた。一方、排卵産物の存在下で卵子と培養した精子では、培養終了時(8-8.5時間後)までその運動性は良好に維持された。

顆粒膜細胞の付着した種々の個数の卵子を種々の容量の精子液中で授精し、8-8.5時間後に卵子を検査した結果、表11に示すように、一定の容量の培養液では、導入卵子数が多いほど、また一定の数の卵子を導入した場合には培養液量が少なくなるほど受精率はそれぞれ高くなった。多数(21-30個)の卵子を導入した場合、10-100 μ lまでのすべての培養液量で常に高い(77-84%)受精率が得られた。し

TABLE 11

FERTILIZATION IN VITRO OF HAMSTER EGGS WITH OR WITHOUT FOLLICULAR CELLS IN A m-KRB MEDIUM

No. of eggs introduced	Vol. of medium during incubation (μl)	No. of trials	No. of eggs examined*	No. of eggs penetrated	No. of eggs undergoing fertilization (%)	No. of polyspermic eggs (%)
1-5	10	6	24	10 (42)	10 (42)	1 (10)
	20	6	23	8 (35)	8 (35)	1 (13)
	50	9	33	6 (18)	6 (18)	0 (0)
6-10	100	7	30	0 (0)	0 (0)	-
	10	4	25	22 (88)	22 (88)	0 (0)
	20	4	29	22 (76)	22 (76)	1 (6)
11-20	50	5	38	13 (34)	13 (34)	1 (8)
	100	5	36	4 (11)	4 (11)	0 (0)
	10	3	40	34 (85)	34 (85)	1 (3)
21-30	20	5	73	57 (78)	57 (78)	5 (9)
	50	5	79	57 (72)	57 (72)	4 (7)
	100	3	50	28 (56)	28 (56)	1 (4)
21-30	10	2	51	43 (84)	43 (84)	2 (5)
	20	2	49	41 (84)	41 (84)	2 (5)
	50	2	45	35 (77)	35 (77)	2 (6)
21-30**	100	3	77	59 (77)	59 (77)	5 (8)
	10	3	68	0 (0)	-	-
	20	3	67	0 (0)	-	-
21-30**	50	3	67	0 (0)	-	-
	100	3	65	0 (0)	-	-

* Eggs were examined 8-8.5 hr after insemination.

** Denuded eggs.

がし、21-30個の裸化卵子を10-100 μ lの精子液に導入した場合、精子侵入卵は全く得られなかった(表11)。

また、多精子侵入率は極めて低かったが(0-13%)、多精子侵入と授精卵数あるいは培養液量との間には一定の関係は見出されなかった。

授精の場におけるBSA濃度の影響について調べた結果、表12に示すように、0、4および8mg/mlの3つの濃度間で受精途上卵の割合(85-97%)に有意差は認められなかったが、雄性前核を有する卵子の割合はBSA濃度が高くなるにつれて増加した。また、多精子侵入の割合もBSA濃度が高くなるにしたがって増加し、8mg/mlの濃度で38%に達した。

Ⅲ. 考 察

本実験の結果から、ラット用のm-KRB液を用いてもハムスター卵子の体外受精が可能であることが明らかとなったが、この場合、卵

TABLE 12
EFFECT OF BSA CONCENTRATION IN A m-KRB MEDIUM ON FERTILIZATION IN VITRO OF HAMSTER EGGS WITH FOLLICULAR CELLS*

BSA conc. (mg/ml)	No. of trials	No. of eggs examined**	No. of eggs undergoing fertilization		No. of polyspermic eggs (%)
			Total (%)	With male pronucleus (%)	
0	3	72	61 (85)	42 (69)	5 (8)
4	3	60	58 (97)	49 (84)	7 (12)
8	3	69	65 (94)	62 (95)	25 (38)

* About 20 eggs with follicular cells were introduced into 40 μ l sperm suspension (1.6-5.8 X 10⁶ cells/ml).

** Eggs were examined 9-9.5 hr after insemination.

管内の排卵産物が共存する必要があることが示唆された。裸化卵子の共存下では、精子の生存性が急速に低下し卵子への侵入も認められなかった。排卵産物はハムスター精子の capacitation (および先体反応) に有効に作用したものと考えられる。Hanada and Chang (1976b) は、本実験と同一の培養液 (m-KRB) を用い、同様の実験を行い、非常に低い受精率が得られなかったが、彼等は平均23個の排卵卵子を $400\mu\text{l}$ の精子浮遊液中で授精したので、排卵産物内の受精に有効な成分が多量 ($400\mu\text{l}$) の培養液によって過度に希釈されたためと考えられる。排卵産物を構成するいかなる成分がハムスター卵子の受精に有効であるのかは本実験の結果からは不明であるが、Gwatkin et al. (1972) は、体外でのハムスター精子の capacitation には顆粒膜細胞とその間を埋めるゼリー状の物質が関与していることを示唆した。しかし、培養液で洗浄後の顆粒膜細胞では capacitation は誘起されないことから (Rogers,

1978; Yamagimachi, 1969b), 有効成分は顆粒膜細胞とゆるく結合している可溶性の物質かもしれない。一方, 卵巣を除去し, 排卵産物の存在しない卵管内に移植したハムスター裸化卵子の体内での受精例が報告されているので (Moore and Bedford, 1978), 体内での精子の capacitation は精子が排卵産物に接する前に完了しているものと思われる。

これまで, 本実験と全く同じ組成から成る m-KRB 液を用いてラット (Toyoda and Chang, 1974; Niwa and Chang, 1974), マウス (Niwa et al., 1980), ヒト (Nishimoto et al., 1982) およびデールマウス (Hanada and Chang, 1978) の卵子の体外受精が可能であることが報告されているが, ラットとマウスでは, m-KRB 液中での培養中に精子の capacitation が誘起され, 裸化卵子の受精が成立するので, ハムスターとは異なる。

血清アルブミンの体外受精における重要性がマウス (Miyamoto and Chang, 1973; Hoppe and Whitten, 1974), ハムスター (Bavister, 1974) お

よビラット (Toyoda and Chang, 1974) で報告されている。本実験では、アルブミンを添加せが排卵産物のみ存在する条件下で高率 (85%) の受精途上卵を得た (表 12)。卵胞液中には高濃度のアルブミンが含まれており (Edwards, 1974), 本実験の排卵産物内にも卵胞液由来のアルブミンが混入していたと考えられるが、少なくとも本実験条件下では培養液へ外因性のアルブミンの添加は必要ではない。一方、アルブミン濃度の増加によって多精子侵入率が高まったので (表 12), これまで卵胞液 (Gwatkin and Andersen, 1969; Yanagimachi, 1969 a, b) や血清 (Baros and Garavagno, 1970; Yanagimachi, 1970) を添加した培養液中でのヒムスター卵子の体外受精で常に高率に多精子侵入が認められたのは、アルブミン濃度が高かったためかもしれない。高濃度のアルブミンは、无体反応を刺激し (Lui et al., 1977), 精子が同時に卵子に侵入する確率を高めるが、卵子の透明帯あるいは多精拒否機構に有害な影響を与え

ていることが考えられる。事実、本実験条件下においては、低濃度(0-4mg/ml)のBSA存在下で常に低率(0-13%)の多精子侵入が認められなかった。

IV、 摘 要

ラット用のm-KRB液を用いてハムスター卵子の体外受精を試みた。さらに、受精におよぶ培養液中のBSA濃度の影響について調べた。得られた結果はつぎのとおりである。

1. 顆粒膜細胞を有した21-30個の卵子を10-100 μ lの精子液中で授精した結果、高い受精率(77-84%)が得られた。一方、同じ条件下で裸化卵子には全く精子侵入が認められなかった。このため、本実験条件下ではハムスター精子のcapacitation誘起に排卵産物が重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

2. BSAを0-8mg/mlの濃度で含む40 μ lの精子液に約20個の排卵卵子を導入した結果、受精途上卵の割合(85-97%)はいずれのBSA

濃度においても有意差がなかった。また、BSA濃度が0から8mg/mlと高まるにつれて多精子侵入率も8から38%に上昇した。

3. 以上のことから、m-KRB液を用いても排卵産物が存在する場合には、再現性の高いハムスター卵子の体外受精が可能であり、培養液中のBSA濃度を低下させることによって高率の単精子受精卵の得られることが明らかにされた。

第3節 ハムスター卵子の体外受精におよぼすエネルギー源の影響

これまで、哺乳動物卵子の体外受精には、血清アルブミンと同様に受精の成立に重要な培養液の成分としてグルコース、ピルビン酸および乳酸が添加されてきた (Rogers, 1978; Bavister, 1981)。これらのエネルギー源のうち、とくにグルコースの重要性がマウス (Hoppe, 1976; 岡本と豊田, 1980; Fraser and Quinn, 1981) およびラット (Niwa and Iritani, 1978) で報告されているが、これらの報告とは逆にグルコースはモルモット精子の先体反応を阻害すること示唆されている (Rogers and Yanagimachi, 1975)。一方、ハムスターでは、ピルビン酸 (Bavister and Yanagimachi, 1977) あるいは乳酸 (Drawland and Meizel, 1981) の先体反応に対する重要性が明らかにされているが、それぞれ異なった実験条件のために矛盾した結果を得ている。前節において、高率の単精子受精卵を得ることのできるハムスターの体外

受精系を確立した。そこで、本実験では、 NaCl , CaCl_2 , および NaHCO_3 だけから成る極めて単純な組成の培養液に種々のエネルギー源を添加し、排卵産物の存在下でハムスター精子の先体反応や受精におよぼす影響について検討した。

I. 実験材料および方法

本実験では、表13に示すように NaCl , CaCl_2 , NaHCO_3 および抗生物質から成る培養液を用いた。実験の目的にしたがって、この基準液に下記のような種々のエネルギー源を添加した。すなわち、(1)種々のエネルギー源の重要性を明らかにするために、D-グルコース (5.56 mM), ピルビン酸-ナトリウム塩 (0.50 mM) あるいは乳酸-ナトリウム塩 (21.58 mM) を種々の組合わせで添加した；(2)グルコース濃度の影響を明らかにするために、0, 0.69, 1.39, 2.78, 5.56 あるいは 8.34 mM の D-グルコースを添加した；さらに、(3)各種の糖類の影響を調べた。

TABLE 13
COMPONENTS OF THE STANDARD MEDIUM

Components	mM
NaCl	Varied(101.5-126.4)
CaCl ₂	1.71
NaHCO ₃	25.07
Penicillin	75µg/ml
Streptomycin	50µg/ml

めに、D-グルコース、D-マンノース、D-フラクトース、D-ガラクトース、L-グルコース、L-フコース、D-ラクトースあるいはD-サッカロースを何れも 5.56 mM 濃度で添加した。(2)の場合以外は、培養液の浸透圧は NaCl の量を変化させることにより 308 mOsmole に調整した。マイクロピペット（エッペン・ドルフ）を用いて、それぞれの培養液 20 μ l をフラスチック製培養皿（35 \times 11 mm；豊島製作所）の中央に滴下し、周囲をパラフィンオイルでおおった後、炭酸ガス培養装置内（37°C，5% 炭酸ガス + 95% 空気）で一昼夜静置し気相と温度とを平衡させた。平衡後の培養液の pH は 7.6-7.8 であった。

成熟雌ハムスター（120-180 g）に過排卵誘起処理を行い（第二章，第二章参照），HCG 投与の 14-16 時間後に動物を屠殺した。卵管を単離した後，培養液の周囲のパラフィンオイル中で卵管膨大部から卵塊を取り出し，顆粒膜細胞に包まれた 20-30 個の卵子を 20 μ l の培養液中に導入した。

成熟雄ハムスター（110-150g）から採取した精巢上体尾部精子を前節と同様の方法で0.5 mlの各種培養液中に浮遊した。この原精子浮遊液20 μ lを卵子を含む培養液に添加して授精を行った。したがって、授精時の培養液量は40 μ lである。また、授精時の精子濃度は $1.4-8.8 \times 10^6$ 精子/mlであった。

授精後、炭酸ガス培養装置内で9-9.5時間培養した後、卵子を才4章の才2節の方法にしたがって固定・染色して、精子侵入の有無を位相差顕微鏡下で観察した。卵子細胞質内に精子尾部をともなった膨化精子頭部あるいは雄性前核を有する卵子を受精卵とし、複数の侵入精子を認めた卵子を多精子侵入卵として分類した。一方、授精後種々の時間に、培養液から毛細ガラス管を用いて吸入した少量の精子液を血球計算板上に滴下し、カバーガラスで覆った後、位相差顕微鏡下で精子の先体反応を調べた。1回の検査につき任意に100匹以上の精子について調べ、活発に運動して

いる精子で頭帽の離脱しているものを先体反応の誘起された精子と判定した。

II. 実験結果

グルコース、ピルビン酸および乳酸の影響

三種のエネルギー源を添加した基準培養液(表13)中で卵子とともに培養されたハムスター精子の先体反応を調べた結果を図15に示す。

エネルギー源を添加しない基準培養液中で培養した精子では先体反応は全く観察されなかった。一方、グルコースの単独添加、グルコースに加えてピルビン酸または乳酸の添加あるいは三種のエネルギー源をすべて添加した場合には、培養時間の増加とともに先体反応誘起率は高まった。しかし、ピルビン酸および乳酸を単独にあるいは一諸に添加した基準培養液中では先体反応の誘起は極めて低率であった。

培養後9-9.5時間で卵子を検査した結果、表14に示すように、受精率の変化は先体反応の

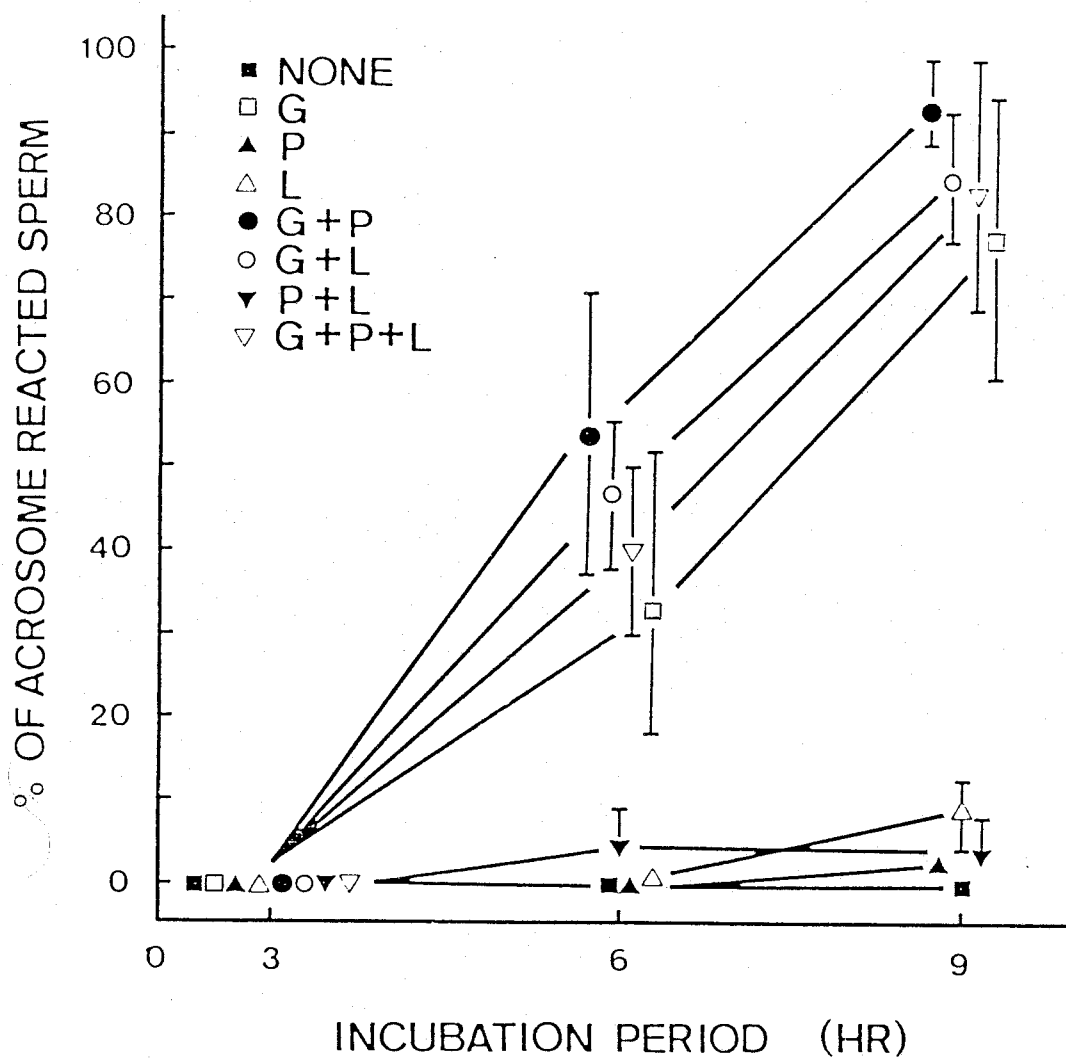


FIG. 15

Acrosome reaction of spermatozoa incubated with hamster eggs with postovulatory oviduct contents in a medium with or without 5.56 mM glucose(G), 0.50 mM sodium pyruvate(P), and 21.58 mM sodium lactate(L) in various combinations.

TABLE 14
EFFECT OF D-GLUCOSE(G) , SODIUM PYRUVATE(P) AND SODIUM LACTATE(L) IN A MEDIUM
ON FERTILIZATION IN VITRO OF HAMSTER EGGS WITH POSTOVULATORY OVIDUCT CONTENTS

Medium with:	No. of trials	No. of eggs examined	No. of eggs undergoing fertilization			No. of polyspermic eggs (%)
			Total (%)	With enlarged sperm head	With male pronucleus (%)	
None	3	69	0 (0)	-	-	-
G	3	70	67 (96) *	8	59 (88)	8 (12)
G+P	4	101	92 (91) *	9	83 (90)	9 (10)
G+L	5	118	105 (89) *	15	90 (86)	9 (9)
G+P+L	3	69	62 (90) *	14	48 (77)	3 (5)
P	6	145	9 (6)	4	5 (56)	0 (0)
L	5	125	29 (23)	9	20 (69)	0 (0)
P+L	4	99	18 (18)	4	14 (78)	0 (0)

Eggs were examined 9-9.5 hr after insemination.

* Significantly different compared with values in the medium without energy sources or with P, L or P+L (p<0.001, χ^2 test).

誘起率にみられた変化とほぼ同様であった。
すなわち、エネルギー源を全く添加しない場合には、受精卵は得られなかったが、ピルビン酸と乳酸の添加の有無にかかわらずグルコースを添加した場合にのみ高い(89-96%)受精率が得られた。ピルビン酸および乳酸を単独あるいは一諸に添加した場合の受精率は低かった(6-23%)。膨化精子頭部の雄性前核への変形率も、グルコースの存在下で高く(77-90%)、無添加の場合には低かった(56-78%)。多精子侵入率は、いずれのエネルギー源を添加した場合においても低率であった(0-12%)。

グルコース濃度の影響: 0-8.34 mM濃度のグルコースを基準培養液に添加したときの受精におよぼす影響を検討した結果、表15に示すように、グルコース濃度の増加にともなって受精率は高くなったが、2.78, 5.56 および 8.34 mMの濃度間では受精率(82-95%)や雄性前核形成率(82-88%)に有意な差は認められなかった。

TABLE 15
EFFECT OF THE CONCENTRATION OF D-GLUCOSE ON FERTILIZATION IN VITRO
OF HAMSTER EGGS WITH POSTOVULATORY OVIDUCT CONTENTS

Conc. of D-glucose (mM)	No. of trials	No. of eggs examined*	No. of eggs undergoing fertilization		No. of polyspermic eggs (%)
			Total (%)	With enlarged sperm head	With male pronucleus (%)
0	3	61	0 (0)	-	-
0.69	3	80	6 (8)	1	5 (83)
1.39	4	88	51 (58)	13	38 (75)
2.78	4	83	68 (82)	12	56 (82)
5.56	2	43	41 (95)	5	36 (88)
8.34	2	41	36 (88)	5	31 (86)

* Eggs were examined 9-9.5 hr after insemination.

種々の糖の影響： D-グルコース以外の種々の糖が受精におよぼす影響について検討した結果，表16に示すように，D-マンノースあるいはD-フラクトースはD-グルコースと同様に精子の先体反応の誘起と卵子の受精に効果のあることが判明した。しかし，L-フコース，D-ラクトースあるいはD-サッカロースでは全く効果は認められなかった。D-ガラクトースでは，先体反応の誘起された割合（12%），卵子の受精率（7%）および雄性前核の形成された卵子の割合（20%）はいずれも低率であった。

III. 考 察

体外受精の結果は培養液を構成する成分によって左右されると考えられるが，これらの成分の受精におよぼす影響を検討する場合には，可能なかぎり単純な培養液を用いることが望ましい。ハムスター精子の生存性や *capacitation* にとって CaCl_2 (Mouira and Chang, 1970; Yanagimachi, 1982) や NaHCO_3 (Bawister, 1981) は

TABLE 16
EFFECT OF DIFFERENT SUGARS ON FERTILIZATION IN VITRO OF HAMSTER EGGS
WITH POSTOVULATORY OVIDUCT CONTENTS AND SPERM ACROSOME REACTION

Sugars added to medium	No. of trials	No. of eggs examined*	No. of eggs undergoing fertilization			% of acrosome reacted spermatozoa (range)
			Total (%)	With enlarged sperm head	With male pronucleus (%)	
D-glucose	2	52	49 (94)	9	40 (82)	79 (76-82)
D-mannose	3	62	54 (87)	7	47 (87)	85 (76-91)
D-fructose	3	60	57 (95)	10	47 (82)	78 (68-84)
D-galactose	3	75	5 (7)	4	1 (20)	12 (5-25)
L-glucose	2	48	0 (0)	-	-	0
L-fucose	2	49	0 (0)	-	-	0
D-lactose	2	45	0 (0)	-	-	0
D-sacchrose	2	44	0 (0)	-	-	0

* Eggs and spermatozoa were examined 9-9.5 hr after insemination.

重要な成分であることが知られているが、排卵産物の存在下では、血清アルブミンの培養液への添加は不必要である（オ4章，オ2節参照）。そこで本実験では，NaCl, CaCl₂ および NaHCO₃ から成る極めて単純な培養液を基準培養液として用いた。

本実験の結果から明らかのように，排卵産物の存在下でのハムスター精子の先体反応や受精にはD-グルコースの添加が必要不可欠であることが示唆された（図15および表14）。精子の capacitation や受精におよぼすD-グルコースの重要性についてはマウス（Hoppe, 1976; 岡本と豊田, 1980; Fraser and Quinn, 1981）やラット（Niwa and Iritani, 1978）においても報告されているが，授精時の排卵産物の有無によつてエネルギー源の要求性は異なっており，裸化卵子への精子侵入にはD-グルコースに加えてピルビン酸あるいは乳酸の添加を必要とする（マウス, Hoppe, 1976; 岡本と豊田, 1980; ラット, Tsunoda and Chang, 1975; 三宅ら, 1981）。

これらのエネルギー源は多くの動物種の卵管内に存在していることが知られており (Iritani et al., 1969, 1971, 1974; Brackett and Mastroianni, 1974), また顆粒膜細胞は体外でD-グルコースを代謝してピルビン酸を産生しうることが報告されている (Donahue and Stern, 1968) ので、洗浄裸化卵子の受精に際してはD-グルコースやピルビン酸を添加する必要があると思われる。しかし、ハムスターでは、前節で示したようにD-グルコース、ピルビン酸および乳酸を添加した培養液中においても洗浄裸化卵子への精子侵入は認められなかったもので、これらのエネルギー源以外に精子の先体反応や卵子の受精に必要な物質が排卵産物内に存在するとと思われる。ハムスターでは、精子の生存性を刺激する作用をもつ (Bavister, 1974) 精子抽出液の存在下での精子の先体反応の誘起にはピルビン酸が最も重要な役割を果たしており、D-グルコースや乳酸は補助的な効果しかないことが報告されている (Bavister and Yanagi-

machi, 1977)。最近, 精子抽出液や雌性生殖器官内に存在しているタウリンが精子の運動性を刺激することが見いだされた (Meizel et al., 1980)。さらに, タウリンとカテコールアミンとの共存下でハムスター-卵子の体外受精が可能であることが見出された (Leibfried and Bavister, 1981)。Drawland and Meizel (1981) は, このような体外受精系を用いて, 精子の先体反応に乳酸が最も重要であることを示唆したが, 彼らの実験系ではD-グルコースが常時含まれており, したがって乳酸の重要性はD-グルコースとの共存下で発揮されるものと考えられる。本実験では, 排卵産物の存在下でD-グルコースがハムスター-精子の先体反応や受精に対して重要な役割を果たしていることが示唆されたが, そのメカニズムについては不明である。

ハムスター-卵子の受精は, $0.69-8.34\text{mM}$ の広い濃度のD-グルコースによって達成されるが, 高率の受精卵は $2.78-8.34\text{mM}$ 濃度で得られた(表

15)。同様に、ラット (Niwa and Iritani, 1978) やマウス (岡本と豊田, 1980) においても、それぞれ $1.39-8.34\text{ mM}$ および $0.69-5.56\text{ mM}$ で受精が可能であるが、最適濃度は 5.56 mM と報告されている。一方、タウリンやエピネフリンが存在すれば、ハムスター精子の先体反応誘起にはさらに低濃度 (0.36 mM) のD-グルコースで充分であることが示唆されている (Drawland and Meizel, 1981)。

マウス、ラットおよびハムスターの場合とは対照的に、モルモット精子の先体反応や受精は、培養液へピルビン酸と乳酸を添加することによって高率に誘起されるが、D-グルコースの添加は阻害的な作用をもつことが示唆されている (Rogers and Yanagimachi, 1975)。Rogers et al. (1979) は、D-グルコース添加による酸化のリン酸化系の抑制効果 (Crabtree 効果) によって先体反応が阻害されるためであると説明しているが、マウスでは酸化のリン酸化系の阻害剤である oligomycin を添加しても先体反応

は誘起されることが知られている (Fraser and Quinn, 1981)。このことは、先体反応や受精におよぼすD-グルコースの作用機序は動物種によって異なることを示している。

D-グルコース、D-フラクトースおよびD-マンノースはいずれも精子に容易に代謝される糖類であり、子宮液 (Lutwak-Mann, 1962; Bishop, 1969) や精液 (Mann, 1964) 中に豊富に存在しているため、生殖器内の移送ならびに受精に際して、精子はこれらの糖を利用していると思われる。体外受精におよぼす影響については、マウス (Hoppe, 1976; Fraser and Quinn, 1981) やラット (Niwa and Iritani, 1978) で報告されているが、D-マンノースがラット卵子の受精に有効であった (Niwa and Iritani, 1978) 以外は、いずれも従来示唆されてきたようなD-グルコースの有効作用を代替することはできなかった。さらに、モルモットでは、D-グルコースを含めたこれらの糖が先体反応に対して阻害的に作用することは本実験の結果 (表16) と

明瞭な対照をなしている。すなわち、D-フラクトースおよびD-マンノースは、ハムスター精子の先体反応や受精に対してD-グルコースと同様に有効な作用を示すが、精子に代謝されにくいD-ガラクトース、L-グルコース、L-フコース、D-ラクトースおよびD-サッカロースではほとんど効果がないか全く無効であった。このような動物種による差は、ハムスター精子がD-グルコースやD-フラクトースを容易に代謝し、その代謝活性は他のゲッ歯動物より高い (Morita and Chang, 1970) ことによるのかもしれない。Drawland and Meizel (1981) は、解糖系の酵素阻害剤である α -chlorohydrin が極めて低濃度で精子のD-グルコース代謝を阻害することを報告しているので、少なくともハムスターにおいては、精子の先体反応に糖代謝が重要な役割を果たしていると考えられる。

IV. 摘 要

NaCl , CaCl_2 および NaHCO_3 からなる単純な

基準培養液を用いて種々のエネルギー源が排卵産物の存在下でハムスター卵子の受精と精子の先体反応におよぼす影響を検討した。得られた結果はつぎのとおりである。

1. 基準培養液中で精子と卵子を培養した結果、9-9.5時間後でさえ精子の先体反応は全く誘起されなかった。レカレ、培養液にD-グルコースを添加すると、ピルビン酸や乳酸の添加の有無にかかわらず高率(61-99%)に精子の先体反応が誘起された。一方、ピルビン酸および乳酸の単独あるいは両者の添加では、先体反応の誘起された精子の割合は低かった(0-13%)。卵子の受精率も精子の先体反応誘起率と同様の変化を示し、D-グルコースを添加した培養液中で高い(89-96%)受精率を得た。

2. 受精におよぼすD-グルコース濃度の影響を検討した結果、受精は0.69-8.34mMの広い範囲の濃度で可能であるが、2.78-8.34mMの濃度で高い(82-95%)受精率が得られた。

3. 受精におよぼす各種の糖の影響を検討した結果、精子に容易に代謝されるD-フラクトースおよびD-マンノースは何れもD-グルコースと同様の効果を発揮し、87-95%の高い受精率が得られた。しかし、非代謝性のD-ガラクトース、L-グルコース、L-フコース、D-ラクトースおよびD-サッカロースの存在下では受精率は極めて低率(0-7%)であった。

4. 以上のことから、ハムスター精子の先体反応や卵子の受精には精子の糖代謝系が重要な役割を果たしていることが示唆された。

第4節 ハムスター卵子の体外受精におけるグルコースの役割

前節において、排卵産物の存在下でハムスター卵子の受精や精子の先体反応に培養液へのグルコースの添加が必要不可欠であることを示唆した。そこで本節の実験では、グルコースが精子の *capacitation*, 先体反応および卵子への侵入等の一連の受精過程のいずれの時期に作用しているかを明らかにするために行われた。

I. 実験材料および方法

本実験では、前節の表13に示したと同じ組成からなる培養液を用いた。培養液の浸透圧は308 m Osmoleであり、炭酸ガス培養装置(37°C, 5%炭酸ガス+95%空気)内で気相と平衡後のpHは約7.8であった。

精巢上体尾部精子を成熟雄ハムスター(125-160 gr)から才4章の才2節と同様の方法を用いて採取した後、培養気相と充分平衡させた

0.5 ml の培養液中に浮遊した。この 20 μ l を、あらかじめプラスチック製培養皿の中央に滴下し周囲をパラフィンオイルでおおった 20 μ l の培養液中に導入して、授精用の精子浮遊液とした。このときの精子濃度は $3.1-5.5 \times 10^6$ 精子/ml であった。

排卵卵子は、成熟雌ハムスター (80-170 gr) に過排卵誘起処理を行い (才 2 章, 才 2 節を参照)、動物を HCG 投与の 14-16 時間後に屠殺した後、卵管膨大部から顆粒膜細胞に包まれた卵子を含む卵塊を採取した。これらの卵子以外に、0.1% のヒアルロニダーゼ処理 (才 2 章, 才 2 節参照) により顆粒膜細胞を取り除き、培養液で二度洗浄後の裸化卵子も授精に用いた。

実験 1 では、グルコース無添加の精子浮遊液 (40 μ l) 中に顆粒膜細胞に包まれた約 20 個の卵子を含む卵塊を導入し、その 4.5-5 時間後に卵子を取り除き、精子侵入に対する卵子の老化の影響を防ぐために、新たに約 20 個の裸

化卵子を導入した。その際、同時に最終濃度が5.56 mMになるように1 μ l のグルコース溶液を添加した。一方、対照として、顆粒膜細胞に包まれた卵子の導入時にグルコースも同時に添加し、上記と同様に4.5-5時間後に卵子を除去し、新たに裸化卵子を再授精した。いずれの場合にも、再授精後1時間おきに3時間後まで精子の生存性、運動性、先体反応誘起の有無および卵子の受精率について検査した。実験2では、グルコースを添加した40 μ l の培養液中で精子だけを5時間前培養後、顆粒膜細胞に包まれた卵塊を導入して授精を行い、授精後1時間おきに4時間後まで精子の生存性、運動性、先体反応誘起の有無および卵子の受精率について検査した。なお、精子の前培養や授精後の培養は炭酸ガス培養装置内で行った。

先体反応は、前節と同様の方法を用いて、位相差顕微鏡下で、1回の検査につき100匹以上の活発に運動する精子の頭帽の有無によっ

て判定した。また、卵子の固定、染色および受精の判定方法は第4章の第2節で述べた方法にしたがって行った。

II. 実験結果

実験1：卵子を含む排卵産物の存在下で、グルコース添加（対照区）あるいは無添加（実験区）の培養液中で培養した精子の生存性は、培養開始直後から良好に維持され、3時間後には5-30%の精子に運動性の hyperactivation (Yanagimachi, 1981) が認められた。4.5-5時間後（すなわち、新鮮な裸化卵子に置換する直前）に調べた結果、グルコースの添加された対照区では、30-50%の精子に hyperactivation が観察され、18%の精子に先体反応が誘起されていた。また、9% (9/100) の卵子に精子侵入が認められた。これに対して、培養液にグルコースを含まない実験区では、0-30%の精子に hyperactivation の誘起が観察されたが、先体反応の誘起および卵子への精子侵入は全く認められなか

った。5時間後に最初に導入した卵子を取り除き、新鮮な裸化卵子を再導入（実験区の場合はグルコースも同時に添加）し、以後1時間毎に精子の運動性や先体反応の誘起率を調べた結果、表17に示すように、精子の生存性の経時的変化は、精子前培養中のグルコースの存在の有無にかかわらず両者の間で差は認められなかった。精子の前培養5時間後にグルコースの添加された実験区では、1時間後に *hyperactivation* の誘起率が急速に増加し（40-50%）、先体反応が認められるようになったが、これらの誘起率は最初からグルコースの添加されていた対照区の同時期の精子に比べて低かった。しかし、2時間後には、両区の間で *hyperactivation* および先体反応の誘起率に特に著しい差は認められなかった。裸化卵子への精子侵入率は、表18に示すように、1および2時間後では何れも実験区に比べて対照区の方が高かったが、3時間後には両者の区間で差は認められなかった。

TABLE 17
MOTILITY, HYPERACTIVATION AND THE ACROSOME REACTION OF HAMSTER SPERMATOZOA
PREINCUBATED FOR 5 HOURS WITH POSTOVULATORY OVIDUCT CONTENTS IN THE MEDIUM
WITH OR WITHOUT GLUCOSE AND FURTHER INCUBATED WITH DENUDED EGGS AND GLUCOSE

With (+) or without (-) glucose		Time of examination (hr after introducing denuded eggs)	No. of trials	% of motile spermatozoa (range)	% of hyper- activated spermatozoa (range)	% of acrosome reaction (range)
During preincubation of sperm with postovulatory oviduct contents ¹⁾	During further incubation of sperm with denuded eggs ²⁾					
+	+	1	5	60-70	50-80	38 (8-74)
		2	5	50-60	60-90	63 (26-84)
		3	5	30-60	70-90	78 (67-89)
-	+	1	4	50-70	40-50	6 (0-28)
		2	4	50-70	40-70	56 (46-75)
		3	4	40-70	70-90	86 (82-93)

1) Spermatozoa were preincubated for 5 hr.

2) The first introduced eggs were removed 4.5-5 hr after preincubation and newly denuded eggs were reintroduced into sperm suspension.

TABLE 18
FERTILIZATION OF DENUDED HAMSTER EGGS BY SPERMATOZOA PREINCUBATED FOR 5 HOURS
WITH POSTOVULATORY OVIDUCT CONTENTS IN THE MEDIUM WITH OR WITHOUT GLUCOSE

During preincubation of sperm with postovulatory oviduct contents ¹⁾	With (+) or without (-) glucose		Time of examination (hr after insemination)	No. of trials	No. of eggs examined	No. of eggs penetrated (%)	No. of eggs undergoing fertilization	
	At insemination ²⁾	of denuded eggs					Total (%)	With pronuclei
+	+		1	3	67	20 (30)	3 (4)	0
			2	4	78	69 (88)	61 (78)	4
			3	4	82	68 (83)	66 (80)	45
-	+		1	3	64	5 (8)	0 (0)	-
			2	3	44	9 (20)	9 (20)	0
			3	3	45	39 (89)	38 (84)	17

1) Spermatozoa were preincubated for 5 hr.

2) The first introduced eggs were removed 4.5-5 hr after preincubation and newly denuded eggs were reintroduced into sperm suspension.

実験2：グルコースは添加されているが、排卵産物無添加の培養液中で5時間前培養した精子の生存率には非常に大きな変異(5-70%)が認められたが、これらの精子に *hyperactivation* や先体反応は全く誘起されなかった。しかし、卵子を含む排卵産物を精子浮遊液に添加した結果、表19に示すように、精子の生存率は、1時間後に50-75%まで回復し、その後培養時間の経過にともなって徐々に低下する傾向が認められた。また、精子の *hyperactivation* や先体反応の誘起も1時間後から認められるようになったが、それがさらに高率に誘起されるためには、その後1-2時間の培養を要した。卵子への精子侵入の割合を継時的に検査した結果、表20に示すように、精子侵入卵は3時間後に初めて認められ(31%)、4時間後には、その割合は82%に達した。

Ⅲ. 考 察

種々の生体液(卵胞液、血清、精巢上体液

TABLE 19
MOTILITY, HYPERACTIVATION AND THE ACROSOME REACTION OF HAMSTER SPERMATOZOA PREINCUBATED FOR 5 HOURS
IN THE MEDIUM WITH GLUCOSE AND FURTHER INCUBATED WITH POSTOVULATORY OVIDUCT CONTENTS

Time of examination (hr after incubation of sperm with postovulatory oviduct contents)	No. of trials	% of motile spermatozoa (range)	% of hyper- activated spermatozoa (range)	% of acrosome reaction (range)
1	7	50-75	0-50	1 (0-2)
2	7	50-70	40-75	31 (13-42)
3	6	30-60	40-70	70 (40-80)
4	6	30-60	50-90	76 (62-84)

TABLE 20
FERTILIZATION OF HAMSTER EGGS WITH POSTOVULATORY OVIDUCT CONTENTS BY
SPERM PREINCUBATED FOR 5 HOURS IN THE MEDIUM CONTAINING GLUCOSE

Time of examination (hr after insemination)	No. of trials	No. of eggs examined	No. of eggs penetrated (%)	No. of eggs undergoing fertilization	
				Total (%)	With pronuclei
2	4	90	0 (0)	-	-
3	5	121	37 (31)	1 (1)	0
4	4	146	119 (82)	91 (62)	7

など)や組織(精子, 副腎など)中には, 精子の生存性を維持するとともにそれを刺激している因子(sperm motility stimulating factor = SMF)の存在することが報告されている(Bavister and Yanagimachi, 1977; Bavister et al., 1978)。本実験においても, 排卵産物の存在下では, グルコース添加の有無にかかわらず精子の生存性は, 5時間の前培養中良好に維持されたが, これは, 排卵産物に依存する同様の因子の作用によるものと考えられる。

精子の hyperactivation は先体反応にさきだって誘起されるので (Barros and Berrico, 1977; Yanagimachi, 1977), 精子の capacitation の完遂と密接に関係した生理的現象であると考えられる。本実験では, 排卵産物が存在しておれば, グルコースの有無にかかわらず hyperactivation の誘起率は増加せず, 4.5-5時間の前培養中に精子の先体反応も全く観察されなかった。しかし, 5時間後にグルコースを添加すると, その1時間後に高率の hyperactivation や先体反応の誘起

が認められたので(表17), ハムスター精子は, 排卵産物の存在下ではグルコースの存在の有無にかかわらず, ある程度の capacitation が誘起されるが, capacitation の最終段階あるいは先体反応の誘起に対してグルコースが重要な作用をおよぼしていることが推察される。このことは, グルコース無添加の場合, 排卵産物とともに9-9.5時間にわたって培養された精子は卵子に全く侵入することができないが(前節の表14), このような条件下で培養5時間後にグルコースを添加すると, その3時間後に高率の卵子に精子侵入が認められる(表18)からも明らかである。グルコースが capacitation の完了や先体反応の誘起に作用していることは, マウス(岡本と豊田, 1980; Fraser and Quinn, 1981), ラット(Niwa and Iritani, 1978)および本実験と異なる条件下で行われたハムスター(Drawland and Meizel, 1981)における実験においても報告されている。

一方, 排卵産物を添加せずにグルコースを

添加した培養液で5時間前培養した精子には、*hyperactivation* や先体反応の誘起は全く観察されなかったが、前培養後に排卵産物を添加すると、その1時間後に両者の現象が誘起されるようになった(表19)。前述のように、排卵産物の存在下で前培養した精子では、3時間後に初めて *hyperactivation* の出現が認められたので、グルコースを含む単純な組成から成る培養液中でハムスター精子の部分的な *capacitation* の誘起が可能であると思われる。本実験で用いた培養液には、血清アルブミンは含まれていないが、Bawister (1973) は、血清アルブミンを含む Tyrode 液中でハムスター精子は完全に *capacitation* を誘起できることを示唆している。しかし、彼の実験では前培養時の精子濃度が高い (10^7 精子/ml 以上) ために、血清アルブミンよりも精巢上体液や精子自身に含まれる SMF が *capacitation* の誘起に関与していた可能性が考えられる。

これらのことから、ハムスター精子の *capa-*

citation は グルコース あるいは 排卵産物の何れかが存在していればある程度誘起されるが、capacitation の完遂とその後の先体反応の誘起には排卵産物とグルコースとが共存する必要のあることが示唆された。

IV. 摘 要

ハムスター精子の capacitation と先体反応の誘起におけるグルコースの役割を明らかにするために実験を行い、つぎのような結果を得た。

1. 排卵産物の存在下では、グルコースの有無にかかわらず精子の生存性は5時間の前培養中良好に維持された。このような条件下で5時間後に初めて精子の hyperactivation が観察されたが、グルコース無添加区では培養時間の経過にともなってその誘起率は増加せず5時間の前培養期間中に精子の先体反応は全く観察されなかった。一方、グルコースのみを含む培養液では、精子の生存性はやや低く、5時間後の前培養中に精子の hyperactivation や先体

反応は観察されなかった。

2. グルコースあるいは排卵産物の無添加の条件下で精子を5時間前培養後に、排卵産物あるいはグルコースをそれぞれ添加すると、1時間後に精子の *hyperactivation* の誘起率の増加と先体反応の誘起が観察された。

3. グルコースおよび排卵産物の共存下では、精子の卵子への侵入は4.5-5時間後に初めて認められたが、グルコースあるいは排卵産物の存在下で5時間前培養された精子に排卵産物あるいはグルコースを添加すると、それぞれ3時間後および1時間後から精子侵入が認められた。

4. これらの結果から、ハムスター精子の *capacitation* はグルコースあるいは排卵産物の何れかが存在していればある程度誘起されるが、*capacitation* の完遂とその後の先体反応の誘起には排卵産物とグルコースの共存していることが必要であると思われる。

第5節

小

括

哺乳動物における体内での受精は，排卵産物が存在する卵管内で起こる。本章では，顆粒膜細胞を有するハムスター卵子の完全合成培養液内での体外受精を試み，ついでそのような条件下で，培養液を構成する成分のうちウシ血清アルブミン（BSA）やエネルギー源（グルコース，ピルビン酸および乳酸）の受精におよぼす影響について検討した。得られた結果は下記の通りである。

1. 修正 KRB 液 (Toyoda and Chang, 1974) を用いて，種々の量の精子液に種々の数のハムスター卵子を導入して体外受精を行った。顆粒膜細胞を有した 21-30 個の卵子を 10-100 μ l の精子浮遊液に導入して授精した結果，高い (77-84%) 受精率が得られた。一方，21-30 個の裸化卵子を導入して授精した場合，受精卵は全く得られなかった。これらのことから，ハムスター卵子の体外受精において排卵産物は重

要な役割を果たしていることが推察された。ある一定の培養液量では導入する卵子数が多いほど、また、導入する卵子の数が一定の場合には、培養液量が少なくなるほどそれぞれ受精率は高くなったので、排卵産物の有効性は量的なものであると考えられる。本実験条件下では、高率(87-100%)に単精子侵入卵を得ることができた。

2. 培養液中のBSA濃度(0-8mg/ml)がハムスター-卵子の体外受精におよぼす影響について検討するために、顆粒膜細胞を有する約20個の卵子を40 μ lの精子液中で授精した。その結果、いずれのBSA濃度においても高い(85-97%)受精率が得られたので、本実験条件下では、BSAは精子のcapacitationや先体反応の誘起に必須のものではないと考えられる。しかし、多精子侵入卵の割合(8-38%)はBSA濃度が高まるにつれて高くなった。

3. D-グルコース、ピルビン酸および乳酸を種々の組み合わせで含む培養液(NaCl, 126.4

mM; CaCl_2 , 1.71 mM; NaHCO_3 , 25.07 mM; Streptomycin sulfate, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Potassium penicilline-G, 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を用いてハムスター-卵子の体外受精を行い, 3種のエネルギー源の受精や先体反応におよぼす影響について検討した。エネルギー源を全く含まない培養液中では, 授精9-9.5時間後でさえ精子の先体反応や卵子への精子侵入は認められなかったが, D-グルコースが含まれておれば, ビルビン酸や乳酸の添加の有無にかかわらず授精9-9.5時間後に高率(61-99%)に精子の先体反応が誘起され, 受精率(89-96%)も高かった。一方, ビルビン酸および乳酸の単独添加あるいは両者が共存する条件下での先体反応誘起率と受精率は, それぞれ2-4%および6-23%と低くなった。D-グルコースを種々の濃度で単独に添加したとき, 受精は0.69-8.34 mMの広範囲の濃度で可能であったが, 2.78-8.34 mMの範囲の濃度で高い(82-95%)の受精率が得られた。

4. 種々の糖をそれぞれ単独に5.56 mM 濃

度で培養液に添加した結果、D-フラクトースあるいはD-マンノースを添加した場合には、D-グルコースと同じように高い受精率(87-95%)が得られたが、非代謝性のD-ガラクトース、L-グルコース、L-フコース、D-ラクトースあるいはD-サッカロースでは受精率は極めて低率(0-4%)であった。これらのことから、ハムスター精子の先体反応や卵子の受精には精子の糖代謝系が重要な役割を果たすことが示唆された。

5、ハムスター精子の *capacitation* と先体反応におけるグルコースの重要性をさらに検討するために2,3の実験を行なった。その結果、排卵産物の存在下での精子の生存性は、グルコースの有無にかかわらず良好に維持されたが、グルコースが存在しなければ先体反応は誘起されなかった。排卵産物のみを含む培養液中で精子を5時間培養後にグルコースを添加したとき、1時間後から *hyperactivation* や先体反応の誘起された精子が徐々に増加し、精子侵

入卵は2時間後に認められた。一方、グルコースのみ含む培養液中では、一部の精子の生存性は維持され、部分的な capacitation は誘起されるが、hyperactivation や先体反応の誘起には排卵産物の存在を必要とした。これらのことから、グルコースと排卵産物の共存下で初めて capacitation の完遂および先体反応の誘起が可能になることが明らかとなった。

ウシヤブタ等の大型家畜では、実験小動物などのように受精実験に供する新鮮な排卵卵を手軽にしかも多量に得ることが困難なため体外受精に関する研究は極めて少なく、とくに精子の *capacitation* や先体反応と受精との関係について未解決の問題が多く残されている。そこで本研究では、大型家畜における体外受精法の確立に資することを目的として、まず実験小動物の透明帯除去卵子を用いて家畜精子の侵入の有無を調べて、これらの精子の *capacitation* や先体反応の誘起に必要な条件を間接的に検討した。また、実験用小哺乳動物として体外受精の実験に広く用いられているハムスターについて、体外受精に関与する2,3の要因について検討した。得られた結果の概要はつぎのとおりである。

I. 透明帯除去卵子への家畜精子の侵入条

件

1. 種々の前処理されたブタおよびウシの精子をハムスター、マウスおよびラットの透明帯除去卵子に授精した結果、何れの精子においても、マウスとラットの卵子への侵入は極めて困難であったが、ハムスター卵子に対しては比較的高い侵入率が得られた。したがって、家畜精子の受精能の検定には、透明帯除去ハムスター卵子が最も有用であることが示唆された。

2. 未經産雌ブタ生殖器（子宮あるいは卵管）内で前培養されたブタ射出精子は、透明帯除去ハムスター卵子に高率に侵入し、*capacitation* の誘起に要する前培養時間は4-5.5時間であると推定された。

3. ウシの射出精子あるいは精巢上体精子をウシ子宮内で2-8.5時間前培養後に透明帯除去ハムスター卵子に授精した結果、侵入卵は精巢上体精子によって低率（3%）に認められ

たにすぎなかった。一方、同じ処理後の射出精子を用いて、体外培養後のウシの成熟卵胞卵への精子侵入例が報告されているので、ウシの場合、*capacitation*の誘起された精子が必ずしも透明帯除去ハムスター卵子に侵入するとは限らないことが示唆された。レガレ、ハムスター卵子に高率に侵入レウるような条件下では、精子はウシ卵胞卵にも侵入レウるようになる可能性もあり、精子の前処理方法についてさらに検討する必要がある。

4. ブタおよびウシの射出精子を化学的成分の明らかな培養(m-KRB)中で前培養後に、透明帯除去ハムスター卵子に授精した結果、精子侵入は極めて困難であった。一方、m-KRB液中で前培養したウシの精巣上体精子は低率(14-15%)ながら透明帯除去ハムスター卵子に侵入したので、精子の*capacitation*類似の生理学的変化は、射出精子よりも精巣上体精子においてより容易に誘起されることが推察された。

II. 透明帯除去ハムスター卵子内に侵入前後の家畜精子の微細構造的観察

1. ブタおよびヤギの射出精子の前処理後の微細構造を透過型電子顕微鏡により観察した。m-KRB 液中で5時間前培養後のブタ精子には形態的变化は認められなかったが、未經産雌ブタ子宮内で5時間前培養したブタ精子の頭帽には、先体反応に特徴的な細胞膜と先体外膜の融合によって形成された小胞が42.5%の精子で観察された。一方、ブタ精子と同様にブタ子宮から回収したヤギ精子にも先体反応が20%の精子で認められたが、これらの精子の赤道帯部位は欠損しており、透明帯除去ハムスター卵子には侵入しうるが intact なヤギ卵子の透明帯を通過できない可能性が示唆された。これらの結果から、未經産雌ブタ子宮はブタやヤギ精子の先体反応を誘起する能力を有することが明らかとなった。

2. ブタの射出精子を m-KRB 液あるいは未

経産雌ブタ子宮内で5時間前培養後に透明帯除去ハムスター卵子に受精し、2時間後に卵子を固定して透過型電子顕微鏡により検査した結果、m-KRB液中で前培養した精子では卵子との膜融合は観察されなかった。子宮回収精子のうち、intactな形態を有した精子は卵子表面に接着しうるが、膜融合は先体反応の誘起された精子にのみ観察された。これらの結果から、ブタ精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入には先体反応が誘起されている必要のあることが明らかとなった。

3. 透明帯除去ハムスター卵子とブタ精子との膜融合や侵入後の形態的变化は哺乳動物の同種間受精の場合と本質的には同様であり、ブタ卵子のかわりに透明帯除去ハムスター卵子を用い、その精子侵入の有無によってブタ精子の受精能力を検定しうることが明らかになった。

Ⅲ. ハムスター卵子の体外受精に関する研

究

1. ハムスター卵子の体外受精におよぼす排卵産物の影響について検討した結果、排卵産物の全く存在しない条件下では受精は起こらず、受精の成立には排卵産物を必要とした。排卵産物内の有効因子は量的に作用しており、多量の培養液で希釈することにより、その有効性が失われることが明らかとなった。約20個の卵子を40 μ lの培養液中でハムスター精巢上体精子と授精することにより、高率の単精子侵入卵を得ることのできる体外受精系を確立し、この方法を用いて、以下に述べる培養液の成分の受精におよぼす影響を検討した。

2. 培養液中に添加した0.4および8mg/mlの牛血清アルブミン(BSA)濃度について検討した結果、いずれの濃度においても高率(85-97%)の受精卵を得たが、BSA濃度が高まるにつれて多精子侵入率の増加(8-38%)が認められた。

3. 培養液にD-グルコース, ビルビン酸および乳酸を種々の組み合わせで添加したときのハムスター精子の先体反応や受精におよぼす影響を検討した。エネルギー源を全く含まない培養液中では, 授精9-9.5時間後でさえ精子の先体反応や卵子への精子侵入は認められなかったが, D-グルコースが含まれておれば, ビルビン酸や乳酸の添加の有無にかかわらず授精9-9.5時間後に高率の先体反応(61-99%)と受精卵(89-96%)を得た。一方, ビルビン酸および乳酸の単独添加あるいは両者が共存する条件下での先体反応誘起率と受精率は, それぞれ2-4% および6-23%とD-グルコース添加区に比べて低かった。D-グルコースを種々の濃度で単独に添加したとき, 受精は0.69-8.34 mM濃度で可能であったが, 高率(82-95%)の受精卵は2.78-8.34 mM濃度で得られた。これらのことから排卵産物の存在下で, ハムスター精子の先体反応や受精にD-グルコースが重要な役割を果たしていることが示唆された。

4. 種々の糖をそれぞれ単独に 5.56 mM 濃度で培養液中に添加したときの受精におよぼす影響について検討した結果, D-グルコース, D-フラクトースあるいはD-マンノースの添加では, 高い受精率 (87-95%) を得たのに対して, D-ガラクトース, L-グルコース, L-フコース, D-ラクトースあるいはD-サッカロースの添加では受精率は極めて低率 (0-4%) であったことから, ハムスター精子の先体反応や受精には精子の糖代謝系が重要であることが示唆された。

5. 受精過程におけるグルコースの作用機作を明らかにするための実験が行われた。排卵産物の存在下での精子の生存性はグルコースの有無にかかわらず良好に維持されたが、グルコースが存在しなければ先体反応は誘起されなかった。排卵産物のみを含む培養液中で精子を5時間前培養後にグルコースを添加したとき, 1時間後から hyperactivation や先体反応の誘起された精子が徐々に増加し, 精子侵入

卵は2時間後に認められた。一方、グルコースのみ含む培養液中では、一部の精子の生存性は維持され、部分的な *capacitation* は誘起されるが、*hyperactivation* や先体反応の誘起には排卵産物の存在を必要とした。これらのことから、グルコースは排卵産物の存在下で *capacitation* の完遂あるいは先体反応に作用していることが示唆された。

謝

辞

稿を終えるにあたり，本研究を命ぜられかつ終始暖かい御指導，御教示を賜わった京都大学教授入谷明博士に深甚の謝意を表す。また，本研究の遂行上たえず有意義な助言と御指導をいただいた京都大学助教授丹羽皓二博士に深く感謝の意を表す。さらに，実験の遂行上たえず有意義な助言と暖かい御協力をいただいた大韓民国江原大学副教授金正翊博士，京都大学助手三宅正史氏ならびに京都大学家畜繁殖学研究室の諸氏に対して深く感謝する。また，電子顕微鏡に関する実験の遂行上たえず暖かい御指導，御教示をいただいた愛媛大学助教授野田善郎博士，ならびに電子顕微鏡の使用をルよく御許可いただいた京都大学教授原田浩博士とその使用に際して有意義な助言と御協力をいただいた農林水産省藤井智え博士に対して深く感謝の意を表す。

引 用 文 献

- 1) Adams, C.E. and Chang, M.C. (1962a) J. Exp. Zool., 151: 155.
- 2) Adams, C.E. and Chang, M.C. (1962b) J. Exp. Zool., 151: 159.
- 3) Austin, C.R. (1951) Aust. J. Sci. Res. Ser. B, 4: 581.
- 4) Austin, C.R. (1952) Nature, 170: 326.
- 5) Austin, C.R. (1956) J. Roy. Microscop. Soc., 75: 141.
- 6) Austin, C.R. (1975) J. Reprod. Fert., 44: 155.
- 7) Austin, C.R. and Bishop, M.W.H. (1958) Proc. Roy. Soc. Ser. B, 149: 241.
- 8) Barros, C. (1974) In; Physiology and Genetics of Reproduction, Part B, Coutinho, E.M. and Fuchs, F. (eds.), Plenum Press, New York.
- 9) Barros, C., Bedford, J.M., Franklin, L.E. and Austin, C.R. (1967) J. Cell Biol., 34: C1.
- 10) Barros, C. and Berrios, M. (1977) J. Exp. Zool., 201: 65.
- 11) Barros, C., Berrios, M. and Herrera, E. (1973) J. Reprod. Fert., 34: 547.
- 12) Barros, C. and Franklin, L.E. (1968) J. Cell Biol., 37: C13.
- 13) Barros, C., Fujimoto, M. and Yanagimachi, R. (1973) J. Reprod. Fert., 35: 89.
- 14) Barros, C. and Garavagno, A. (1970) J. Reprod. Fert., 22: 381.
- 15) Barros, C., Gonzales, J., Herrera, E., and Bustos-Obregon, E. (1978) Contraception, 17: 87.
- 16) Barros, C., Gonzalez, J., Herrera, E. and Bustos-Obregon, E. (1979) Andrologia, 11: 197.
- 17) Barros, C. and Herrera, E. (1977) J. Reprod. Fert., 49: 47.
- 18) Bavister, B.D. (1973) J. Reprod. Fert., 35: 161.

- 19) Bavister, B.D. (1974) J. Reprod. Fert., 38: 431.
- 20) Bavister, B.D. (1981) In; Fertilization and Embryonic Development in vitro, Mastroianni, L. and Biggers, J.D. (eds.), Plenum Press, New York.
- 21) Bavister, B.D., Rogers, B.J. and Yanagimachi, R. (1978) Biol. Reprod., 19: 358.
- 22) Bavister, B.D. and Yanagimachi, R. (1977) Biol. Reprod., 16: 228.
- 23) Bedford, J.M. (1968) Amer. J. Anat., 123: 329.
- 24) Bedford, J.M. (1970) Biol. Reprod. Suppl., 2: 128.
- 25) Bedford, J.M. (1972) Amer. J. Anat., 133: 213.
- 26) Bedford, J.M. and Cooper, G.W. (1978) In; Membrane Fusion, Poste, G. and Nicolson, G.L. (eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 27) Bedford, J.M., Moore, H.D.M. and Franklin, L.E. (1979) Exp. Cell Res., 119: 119.
- 28) Biggers, J.D., Whitten, W.K. and Whittingham, D.G. (1971) In; Methods in Mammalian Embryology, Daniel, Jr, J.C. (ed.), Freeman, San Francisco.
- 29) Bishop, M.W.H. (1969) In; The Mammalian Oviduct, Hafez, E.S.E. and Blandau, R.J. (eds.), Univ. Chicago Press, Chicago.
- 30) Blandau, R.J. (1969) In; The Mammalian Oviduct, Hafez, E.S.E. and Blandau, R.J. (eds.), Univ. Chicago Press, Chicago.
- 31) Brackett, B.G. and Mastroianni, L. (1974) In; The Oviduct and Its Functions, Johnson, A.D. and Foley, C.W. (eds.), Academic Press, New York.
- 32) Brackett, B.G., Evans, J.R., Donawick, W.J., Boice, M.L. and Cofone, M.A. (1980) Biol. Reprod., 23: 189.

- 33) Brackett, B.G., Mills, J.A. and Jeites, G.G. (1972) *Fertil. Steril.*, 23: 898.
- 34) Brackett, B.G. and Oliphant, G. (1975) *Biol. Reprod.*, 12:260.
- 35) Byrd, W. (1981) *J. Exp. Zool.*, 215: 35.
- 36) Chang, M.C. (1951) *Nature*, 168: 697.
- 37) Chang, M.C. (1952) *J. Exp. Zool.*, 121: 351.
- 38) Chang, M.C. (1959) *Nature*, 184: 466.
- 39) Chang, M.C. and Hunt, D.M. (1968) *J. Exp. Zool.*, 167: 419.
- 40) Chang, M.C. and Hunter, R.H.F. (1975) In; *Handbook of Physiology*, Vol. 5, Greep, R.O. (ed.), *Amer. Physiol. Soc.*, Washington.
- 41) Clarke, G.N. and Yanagimachi, R. (1978) *J. Exp. Zool.*, 205: 125.
- 42) Dan, J.C. (1952) *Biol. Bull.*, 103: 54.
- 43) Dan, J.C. (1967) In; *Fertilization*, Metz, C.B. and Monroy, A. (eds.), *Academic Press*, New York.
- 44) Dautzier, L., Thibault, C. and Wintenberger, S. (1954) *C. R. Acad. Sci.*, 238: 844.
- 45) Donahue, R.P. and Stern, S. (1968) *J. Reprod. Fert.*, 17: 395.
- 46) Dravland, E. and Meizel, S. (1981) *Gamete Res.*, 4: 515.
- 47) Edwards, R.G. (1974) *J. Reprod. Fert.*, 37: 189.
- 48) Edwards, R.G., Bavister, B.D. and Steptoe, P.C. (1969) *Nature*, 227: 1307.
- 49) Epel, D. (1980) In; *The Cell Surface: Mediator of Developmental Processes*, Subtelny, S. and Wessells, N.K. (eds.), *Academic Press*, New York.
- 50) Esbenshade, K.L. and Clegg, E.D. (1980) *Amer. J. Vet. Res.*, 41: 1137.

- 51) Franklin, L.E. (1970) Biol. Reprod. Suppl., 2: 159.
- 52) Fraser, L.R. and Quinn, P.J. (1981) J. Reprod. Fert., 61: 25.
- 53) Fulka, Jr, J., Pavlok, A. and Fulka, J. (1982) J. Reprod. Fert., 64: 495.
- 54) Gwatkin, R.B.L. (1977) Fertilization Mechanisms in Man and Mammals, Plenum Press, New York.
- 55) Gwatkin, R.B.L. and Andersen, O.F. (1969) Nature, 224, 1111.
- 56) Gwatkin, R.B.L., Andersen, O.F. and Hutchinson, C.F. (1972) J. Reprod. Fert., 30: 389.
- 57) Hanada, A. and Chang, M.C. (1976a) J. Reprod. Fert., 46: 239.
- 58) Hanada, A. and Chang, M.C. (1976b) J. Reprod. Fert., 46: 105.
- 59) Hanada, A. and Chang, M.C. (1978) J. Exp. Zool., 203: 277.
- 60) Hanada, A. and Nagase, H. (1981) Jap. J. Anim. Sci., 27: 113.
- 61) Hoppe, P.C. (1976) Biol. Reprod., 15: 39.
- 62) Hoppe, P.C. and Whitten, W.K. (1974) J. Reprod. Fert., 39: 433.
- 63) Hosoi, Y., Niwa, K., Hatanaka, S. and Iritani, A. (1981) Biol. Reprod., 24: 637.
- 64) Hunter, R.H.F. (1972) J. Reprod. Fert., 29: 395.
- 65) Hunter, R.H.F. (1981) J. Reprod. Fert., 63: 109.
- 66) Hunter, R.H.F. and Hall, J.P. (1974) J. Exp. Zool., 188: 203.
- 67) Iritani, A., Gomes, W.R. and VanDemark, N.L. (1969) Biol. Reprod., 1: 72.
- 68) Iritani, A., Nishikawa, Y., Gomes, W.R. and VanDemark, N.L. (1971) J. Anim. Sci., 33: 829.
- 69) Iritani, A. and Niwa, K. (1977) J. reprod. Fert., 50: 119.
- 70) Iritani, A., Niwa, K. and Imai, H. (1978) J. Reprod. Fert., 54: 379.
- 71) Iritani, A., Sato, E. and Nishikawa, Y. (1974) J. Anim. Sci.,

39: 582.

- 72) Iwamatsu, T. and Chang, M.C. (1969) *Nature*, 224: 919.
- 73) Jamil, K. and White, I.G. (1981) *Arch. Androl.*, 7: 283.
- 74) Johnson, W.L. and Hunter, A.G. (1972) *Biol. Reprod.*, 7: 332.
- 75) Kim, C.-I. (1981) *In vitro Fertilization of Goat Oocytes with Capacitated Spermatozoa*, Ph. D. Dissertation, Kyoto Univ., Kyoto.
- 76) Kim, C.-I., Niwa, K., Imai, H. and Iritani, A. (1980) *J. Exp. Zool.*, 213: 181.
- 77) Leibfried, M.L. and Bavister, B.D. (1981) *Gamete Res.*, 4: 57.
- 78) Lorton, S.P. and First, N.L. (1979) *Biol. Reprod.*, 21: 301.
- 79) Lui, C.W., Cornett, L.E. and Meizel, S. (1977) *Biol. Reprod.*, 17: 34.
- 80) Lutwak-Mann, C. (1962) *Biochim. Biophys. Acta*, 58: 637.
- 81) Mahi, C.A. and Yanagimachi, R. (1976) *J. Exp. Zool.*, 196: 189.
- 82) Mann, T. (1964) *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*, Methuen, London.
- 83) Meizel, S. (1978) In; *Development in Mammals 3*, Johnson, M.H. (ed.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 84) Meizel, S., Lui, C.W., Working, P.K. and Mersny, R.J. (1980) *Dev. Growth Differ.*, 22: 483.
- 85) 三宅正史・丹羽昭二・入谷明(1981) 第72回日本畜学会講演要旨, pp. 146.
- 86) Miyamoto, H. and Chang, M.C. (1973) *J. Reprod. Fert.*, 32: 193.
- 87) Moore, H.D.M. and Bedford, J.M. (1978) *Biol. Reprod.*, 19: 879.
- 88) Mori, T. and Uchida, T.A. (1981) *J. Reprod. Fert.*, 63: 231.
- 89) Morita, Z. and Chang, M.C. (1970) *Biol. Reprod.*, 3: 169.
- 90) Nicander, L. and Bane, A. (1962) *Z. Zellforsch.*, 57: 390.
- 91) Nishimoto, T., Yamada, I., Niwa, K., Mori, T., Nishimura, T.

- and Iritani, A. (1982) J. Reprod. Fert., 64: 115.
- 92) Niwa, K. and Chang, M.C. (1974) J. Exp. Zool., 189: 353.
- 93) Niwa, K. and Chang, M.C. (1975) J. Reprod. Fert., 44: 305.
- 94) Niwa, K., Imai, H., Kim, C.-I. and Iritani, A. (1980) J. Reprod. Fert., 58: 109.
- 95) Niwa, K. and Iritani, A. (1978) J. Reprod. Fert., 53: 267.
- 96) Noda, Y.D. and Yanagimachi, R. (1976) Dev. Growth Differ., 18: 15.
- 97) 岡本正則・豊田裕 (1980) 日畜会報, 51: 171.
- 98) Pavlok, A. (1980) Folia Biol., 26: 188.
- 99) Pavlok, A. (1981) Int. J. Fert., 26: 101.
- 100) Peterson, R.N., Russell, L. Bundman, D. and Freund, M. (1978) Biol. Reprod., 19: 459.
- 101) Pikó, L. and Tyler, A. (1964) Proc. Vth Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Trento, 2: 372.
- 102) Quinn, P. (1979) J. Exp. Zool., 210: 497.
- 103) Rogers, B.J. (1978) Gamete Res., 1: 165.
- 104) Rogers, B.J., Campen, H.V., Ueno, M., Lambert, H., Bronson, R. and Hale, R. (1979) Fertil. Steril., 32: 664.
- 105) Rogers, B.J., Chang, L. and Yanagimachi, R. (1979) J. Exp. Zool., 207: 107.
- 106) Rogers, B.J. and Yanagimachi, R. (1975) Biol. Reprod., 13: 568.
- 107) Rudak, E., Jacobs, P.A. and Yanagimachi, R. (1978) Nature, 274: 911.
- 108) Russell, L., Peterson, R.N. and Freund, M. (1980) Anat. Rec., 198: 449.
- 109) Shams-Borhan, G. and Harrison, R.A.P. (1981) Gamete Res., 4: 407.

- 110) Soupart, P. and Strong, P.A. (1974) *Fertil. Steril.*, 25: 11.
- 111) Stambaugh, R. and Smith, M. (1978) *J. Exp. Zool.*, 203: 135.
- 112) Stefanini, M., Ōura, C. and Zamboni, L. (1969) *J. Submicr. Cytol.*, 1: 1.
- 113) Szöllösi, D. and Hunter, R.H.F. (1973) *J. Anat.*, 116: 181.
- 114) Szöllösi, D. and Hunter, R.H.F. (1978) *J. Anat.*, 127: 33.
- 115) Szöllösi, D. and Ris, H. (1961) *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 10: 275.
- 116) Talbot, P. and Chacon, R.S. (1982) *Fertil. Steril.*, 37: 240.
- 117) Talbot, P. and Franklin, L.E. (1974) *J. Exp. Zool.*, 189: 321.
- 118) Thibault, C. and Dausier, L. (1961) *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 1: 277.
- 119) Thibault, C., Dausier, L. and Wintenberger, S. (1954) *C. R. Soc. Biol.*, 148: 789.
- 120) Thompson, R.S., Smith, D.M. and Zamboni, L. (1974) *Fertil. Steril.*, 25: 222.
- 121) 豊田裕 (1979) "性I", 代謝, Vol. 16, 荻田善一・松本圭史 (編), 中山書店, 東京.
- 122) Toyoda, Y. and Chang, M.C. (1974) *J. Reprod. Fert.*, 36: 9.
- 123) 豊田裕・漆芳明・板垣任明・星雅樹・高杉真・杉本正仁 (1981) 第72回日畜学会講演要旨, pp. 144.
- 124) Toyoda, Y., Yokoyama, M. and Hosi, T. (1971) *Jap. J. Anim. Sci.*, 16: 147.
- 125) Tsunoda, Y. and Chang, M.C. (1975) *J. Reprod. Fert.*, 44: 139.
- 126) Weinmann, D.E. and Williams, W.L. (1964) *Nature*, 203: 423.
- 127) Wolf, D.P., Inoue, M. and Stark, R.A. (1976) *Biol. Reprod.*, 15: 213.
- 128) Wright, Jr, R.W. and Bondioli, K.R. (1981) *J. Anim. Sci.*, 53: 702.

- 129) Yanagimachi, R. (1969a) J. Reprod. Fert., 18: 275.
- 130) Yanagimachi, R. (1969b) J. Exp. Zool., 170: 269.
- 131) Yanagimachi, R. (1970) Biol. Reprod., 3: 147.
- 132) Yanagimachi, R. (1972a) J. Reprod. Fert., 28: 477.
- 133) Yanagimachi, R. (1972b) Anat. Rec., 174: 9.
- 134) Yanagimachi, R. (1977) In; Immunology of Gametes, Edidin, E. and Johnson, M.H. (eds.), Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- 135) Yanagimachi, R. (1978) In; Current Topics in Developmental Biology, Vol. 12, Academic Press, New York.
- 136) Yanagimachi, R. (1981) In; Fertilization and Embryonic Development in vitro, Mastroianni, L. and Biggers, J.D. (eds.), Plenum Press, New York.
- 137) Yanagimachi, R. (1982) Gamete Res., 5: 323.
- 138) Yanagimachi, R. and Chang, M.C. (1963) Nature, 200: 281.
- 139) Yanagimachi, R. and Chang, M.C. (1964) J. Exp. Zool., 156: 361.
- 140) Yanagimachi, R., Nicolson, G.L., Noda, Y.D. and Fujimoto, M. (1973) J. Ultrastruct. Res., 43: 344.
- 141) Yanagimachi, R. and Noda, Y.D. (1970a) J. Ultrastruct. Res., 31: 486.
- 142) Yanagimachi, R. and Noda, Y.D. (1970b) J. Ultrastruct. Res., 31: 465.
- 143) Yanagimachi, R. and Noda, Y.D. (1970c) Amer. J. Anat., 128: 429.
- 144) Yanagimachi, R. and Usui, N. (1974) Exp. Cell Res., 89: 161.
- 145) Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B.J. (1976) Biol. Reprod., 15: 471.

Studies on Fertilization in vitro of Hamster Eggs with Spermatozoa from Different Species

Hiroshi IMAI

SUMMARY

Most of the mammalian spermatozoa should be capacitated and acrosome reacted to be able to penetrate an egg. Many aspects of these physiological and morphological changes occurred in spermatozoa have been investigated using in vitro fertilization techniques mainly in laboratory animals. Since freshly ovulated eggs are not easily available in large domestic animals such as pig, cattle and goat few works on sperm capacitation and the acrosome reaction of spermatozoa have been reported. The present study was to investigate the possibility of the use of the zona-free rodent eggs for indirect assessment of fertilizing capacity of spermatozoa from domestic animals. Some factors involved in capacitation and the acrosome reaction of spermatozoa and fertilization in vitro of eggs in golden hamster were also investigated. Results obtained here are summarized as follows.

I. Studies on Penetration of Spermatozoa from Domestic Animals into Zona-Free Rodent Eggs

(1) Insemination in vitro of zona-free rodent eggs with boar and bull spermatozoa

When boar and bull spermatozoa were preincubated under various conditions and used for insemination of hamster, mouse or rat eggs from which the zona pellucida had been removed by enzymes. Relatively high proportions of zona-free hamster eggs could be penetrated, but penetration of mouse and rat zona-free eggs was very difficult.

It was suggested that zona-free hamster eggs could be used for assessment of the fertilizing capacity of spermatozoa from domestic animals.

(2) Penetration in vitro of boar spermatozoa into zona-free hamster eggs

When ejaculated boar spermatozoa were preincubated for 4-5.5 hr in the uteri or oviducts isolated from gilts and inseminated into zona-free hamster eggs in a modified Krebs-Ringer bicarbonate (m-KRB) solution, high proportions (69-100%) of eggs were penetrated 2 hr after insemination. Since it has been reported that these spermatozoa can penetrate pig oocytes matured in culture, it seems that some physiological changes were occurred in spermatozoa during incubation in the isolated female reproductive tracts and that these changes might be concomitant with capacitation and/or the acrosome reaction of boar spermatozoa. It was further inferred that the time requirement for inducing these changes was 4-5.5 hr in the present experimental conditions.

(3) Penetration in vitro of bull spermatozoa into zona-free hamster eggs

When ejaculated or epididymal bull spermatozoa preincubated for 2-8.5 hr in the isolated cow uteri were inseminated to zona-free hamster eggs, less than 3% of the eggs were penetrated only by epididymal spermatozoa. Since it has been reported that bull spermatozoa prepared by the same procedures as in the present study were able to penetrate cattle oocytes matured in culture, it is suggested that bull spermatozoa acquired an ability to penetrate cattle oocytes do not always penetrate zona-free hamster

eggs. However, if more suitable condition allowing spermatozoa to penetrate high proportion of zona-free hamster eggs was developed, it may also allow penetration of the intact cattle eggs.

- (4) Possibility of inducing capacitation of domestic animal spermatozoa in a chemically defined medium

When ejaculated boar and bull spermatozoa were preincubated for various times in a m-KRB medium and inseminated to zona-free hamster eggs, no sperm penetration was observed. However, low proportions (14-15%) of zona-free hamster eggs were penetrated only by epididymal bull spermatozoa preincubated for 0-5 hr in a m-KRB medium. These results suggest that some physiological changes similar to sperm capacitation may be induced easier in epididymal spermatozoa than ejaculated ones.

II. Ultrastructural Observations of Boar and Goat Spermatozoa

before and after Penetration of Zona-Free Hamster Eggs in vitro

- (1) Ultrastructural observations of the acrosome reactions of boar and goat spermatozoa

No morphological changes were observed in boar spermatozoa preincubated for 5 hr in a m-KRB medium. In contrast, when spermatozoa were preincubated for 5 hr in the isolated uterus from maturing gilts, the acrosome reaction was observed in 42.5% of spermatozoa. In this case, the acrosome reaction was judged from fused membrane vesicles formed by plasma and outer acrosomal membranes at the acrosomal cap region. The acrosome reaction was also observed in 20% of goat spermatozoa preincubated for 5 hr in the isolated from maturing gilts, but a portion of the equatorial segment had been almost disappeared in the reacted spermatozoa.

This morphological deficiency in the goat spermatozoa partly elucidate the failure of fertilization in vitro of intact goat oocytes as has been previously reported. These results suggest that the isolated uterus from maturing gilts have an ability to induce the acrosome reaction of boar and goat spermatozoa.

(2) Ultrastructural observations of boar spermatozoa penetrating zona-free hamster eggs

Boar ejaculated spermatozoa were preincubated for 5 hr in a m-KRB medium or in the isolated uterus from maturing gilt and used for insemination of zona-free hamster eggs. The spermatozoa and eggs were fixed for electron microscopic observations 2 hr after insemination. Spermatozoa preincubated in a m-KRB medium never penetrated zona-free hamster eggs, and no structural changes were observed in their acrosomes. The acrosome reaction was observed at the acrosomal cap region of spermatozoa preincubated in the isolated uterus. Only acrosome reacted spermatozoa were able to fuse with the membrane of hamster eggs. Manner of sperm-egg membrane fusion was essentially the same as that of homologous fertilization in other species, only microvilli of the eggs surrounding the postacrosomal region fused with plasma membrane of spermatozoa.

III. Studies on Fertilization of Hamster Eggs in vitro

(1) Effect of postovulatory oviduct contents on fertilization in vitro of hamster eggs

High proportions (84-88%) of hamster eggs were fertilized when 6-30 freshly ovulated eggs were inseminated with epididymal spermatozoa in 10 μ l of m-KRB medium containing postovulatory oviduct

contents and examined 8-8.5 hr after insemination. No fertilization was observed when denuded eggs were introduced into sperm suspension. Furthermore, there was an intimate interaction between fertilization rates and volume of the fertilization medium or the number of eggs with cumulus clot introduced. The present system for fertilization of hamster eggs in vitro is quite reproducible and provides high proportion of normal fertilization with monospermy.

(2) Effect of BSA concentrations on fertilization in vitro of hamster eggs

In a m-KRB medium containing 0, 4 or 8 mg/ml of BSA very high proportions (87-97%) of eggs were fertilized, but with increasing of BSA concentration the incidence of polyspermic fertilization increased to 38% (8 mg BSA /ml) from 8% (without BSA).

(3) Effects of glucose, pyruvate and lactate on fertilization in vitro of hamster eggs

Hamster eggs with postovulatory oviduct contents were inseminated by epididymal spermatozoa in a simple defined medium (SDM) consisting of NaCl, CaCl₂ and NaHCO₃, without serum albumin, but supplemented with different combinations of energy sources. None of eggs were fertilized in SDM without any energy sources. However, in SDM with D-glucose (5.56 mM) but without pyruvate and/or lactate, high proportions of acrosome reacted spermatozoa (78-94%) and eggs fertilized (89-96%) were obtained 9-9.5 hr after insemination. With only pyruvate (0.50 mM) or lactate (21.58 mM) as substrates, or with both pyruvate and lactate, the acrosome reaction and fertilization occurred in only 2-4% of spermatozoa and 6-23%

of eggs, respectively. When D-glucose ranging in concentration from 2.78-8.34 mM was added, high proportions (82-95%) of the eggs inseminated were found to be fertilized. These results suggest that in the presence of postovulatory oviduct contents D-glucose has an important role for hamster sperm acrosome reaction and fertilization of eggs in vitro.

(4) Effects of D-glucose and other sugars on fertilization in vitro of hamster eggs

Substituting D-galactose, L-glucose, L-fucose, D-lactose or D-saccharose for D-glucose (all at 5.56 mM) added in SDM resulted in very low rates of acrosome reacted sperm (0-12%) and fertilized eggs (0-7%). However, in the presence of metabolizable sugars, such as D-glucose, D-mannose, or D-fructose, the acrosome reaction was seen in 78-85% of the spermatozoa examined and 87-95% of the eggs fertilized. These results suggest that glycolytic metabolism is necessary for hamster spermatozoa to induce acrosome reaction and to achieve fertilization of eggs in vitro.

(5) The role of glucose on capacitation and acrosome reaction of hamster spermatozoa

Sperm motility was well maintained in SDM containing post-ovulatory oviduct contents regardless of the presence or absence of glucose, but acrosome reaction of spermatozoa was induced only in the presence of glucose. When spermatozoa were incubated in SDM containing postovulatory oviduct contents and then glucose was supplemented into the medium 5 hr after incubation, both of the numbers of spermatozoa showing hyperactivated motility and acrosome reaction dramatically increased from 1 hr after the

addition of glucose. On the other hand, a portion of spermatozoa survived and these were partially capacitated during incubation in SDM containing glucose alone. However, postovulatory oviduct contents were required for the induction of hyperactivation and acrosome reaction. These results suggest that postovulatory oviduct contents and glucose have a synergistic role on final stages of capacitation and acrosome reaction of hamster spermatozoa.